COUNTWAY LIBRARY
HC 6EBF

BOSTON
MEDICAL LIBRARY
8 THE FENWAY

NAUNYN-SCHMIEDEBERGS

ARCHIV

FÜR

EXPERIMENTELLE PATHOLOGIE

UND

PHARMAKOLOGIE

UNTER MITWIRKUNG VON FACHGENOSSEN

HERAUSGEGEBEN VON

DR. F. BÜCHNER
PROFESSOR DER PATHOLOGIE
FREIBURG

DR. L. HEILMEYER
PROFESSOR DER INNEREN MEDIZIN
FREIBURG

DR. W. HEUBNER
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
BERLIN

204. BAND

MIT 229 TEXTABBILDUNGEN

BERLIN UND HEIDELBERG
SPRINGER-VERLAG
1947

33056

BOSTON
MAY 11 1950
MEDICAL LIBRARY

CATALOGUED
MAY 11 1950

VERÖFFENTLICHT UNTER ZULASSUNG NR. US-W-1093
DER NACHRICHTENKONTROLLE DER MILITÄRREGIERUNG
DRUCK DER UNIVERSITÄTSDRUCKEREI H. STÜRTZ AG., WÜRZBURG
(UNTER VERWALTUNG DER AMERIKANISCHEN MILITÄRREGIERUNG)
SPRINGER-VERLAG IN BERLIN UND HEIDELBERG
1000 EXEMPLARE — PRINTED IN GERMANY

Inhalt des 204. Bandes.

Seite

An unsere Leser und Mitarbeiter 1

Asen, Hans, Zum Wirkungsmechanismus cholinergischer Stoffe. V. Mit 8 Textabbildungen. (Greifswald, 11. 1. 1918.) 67

Bergstermann, H. und **H. D. Lummer,** Die Wirkung von Schwefelwasserstoff und seinen Oxydationsprodukten auf Bernsteinsäuredehydrase. (Essen-Werden, 8. 5. 1911; Jena, 25. 4. 1920.) 509

Blömer, Klaus und **Manfred Kiese,** Das Verhalten des leichtabspaltbaren Bluteisens bei der Kohlenoxydvergiftung. Mit 3 Textabbildungen. (Berlin, 2. 8. 1921; Stettin, 28. 2. 1910.) 377

Bock, Marianne, Heinzkörper- und Methämoglobinbildung durch Methylenblau. Mit 1 Textabbildung. (Herford/Westf., 3. 1. 1906.) 595

Credner, Karl s. **Peter Holtz.**

— s. **Peter Holtz** und **Fritz Heepe.**

— s. **Peter Holtz** und **Hans-Günther Kroneberg.**

Decristoforo, J. und **S. Welter,** Unmittelbare Kreislaufwirkungen des Apomorphins. Mit 7 Textabbildungen. 76

Enger, R. †, Nephrin ,das blutdrucksteigernde Hormon der Niere. Mit 3 Textabbildungen. 217

Frey, Joachim, Über Beeinflussung des Muskelinnendruckes beim Menschen. Mit 4 Textabbildungen. (Jena, 11. 6. 1905.) 585

Gremels, Hans, Walther Straub †. Mit einem Bildnis. (Großbreitenbach in Th., 9. 12. 1896.) 2

— A. I. Clark zum Gedenken. (Großbreitenbach in Th., 9. 12. 1896.) . . . 593

Groß, Fr. und **Karl Matthes,** Untersuchungen über das Wirkungsbild gefäßaktiver Pharmaka beim Menschen. III. Mitteilung. Periodisches Atmen nach Pervitin und Ephedrin. Mit 2 Textabbildungen. (Jena, 16. 1. 1905.) 57

Haas, Elisabeth, Studien über Methämoglobinbildung. XXVIII. Mitteilung. Dinitrotolylhydroxylamin. Mit 1 Textabbildung. (Ludwigshafen a. Rh., 10. 10. 1916.) 130

— Atropin und Adsorbentien in vivo. Mit 1 Textabbildung. (Ludwigshafen a. Rh., 10. 10. 1916.) 369

— s. **Wolfgang Heubner.**

Haas, Hans T. A., Über die Störung des Kohlehydratstoffwechsels durch 1, 2, 4-Dinitrophenol und Pervitin und ihre Beeinflussung durch Ascorbinsäure und Nebennierenrindenhormon. (Kleve in Rhld., 23. 1. 1907.) . . 110

— Diureseversuche an Ratten und Kaninchen mit Harnstoff und Harnstoffderivaten. (Kleve in Rhld., 23. 1. 1907.) 166

Heepe, Fritz s. **Peter Holtz** und **Karl Credner.**

Heim, Fritz, Änderung von Funktion und Erregbarkeit des Atemzentrums bei elektrischer Vagusreizung. Mit 7 Textabbildungen. (Würzburg, 26. 4. 1910.) 203

— Die Bedeutung der experimentellen Änderung der Aminooxydase-Aktivität für die Adrenalinwirkung. (Würzburg, 26. 4. 1910.) 520

Seite

Heubner, Wolfgang, Ein halb Jahrhundert Pharmakologie. (Leipzig, 18. 6. 1877.) 20
— Historische Notiz über die Entdeckung der Synapsen im autonomen Nervensystem mit Hilfe des Nicotins. (Leipzig, 18. 6. 1877.) 33
— Weitere Notiz über Benzedrin und Pervitin. (Leipzig, 18. 6. 1877.). . . 367
— und **Elisabeth Haas,** Über den Alkaloidgehalt alkalischer Magenmittel. (Leipzig, 18. 6. 1877; Ludwigshafen a. Rh., 10. 10. 1916.). 375
— **Manfred Kiese, Margarete Stuhlmann** und **Waltraud Schwartzkopff-Jung,** Der Hämoglobingehalt normalen Blutes. Mit 1 Textabbildung. (Leipzig, 18. 6. 1877; Stettin, 28. 6. 1910; Riesa. d. Elbe, 7. 11. 1906; Varchentin in Mecklbg., 23. 6. 1921.) 313
Hildebrandt, Fritz, Über Kumulation der Digitalisglykoside am Meerschweinchenherzen. (Mannheim, 3. 11. 1887.) 662
Holtz, Peter und **Karl Credner,** Dopadecarboxylase, Renin und renale Hypertonie. Mit 8 Textabbildungen. (Stolberg in Rhld., 6. 2. 1902; Brandenburg, 6. 12. 1912.) 244
— — und **Fritz Heepe,** Über die Beeinflussung der Diurese durch Oxytyramin und andere sympathicomimetische Amine. Mit 8 Textabbildungen. (Stolberg in Rhld., 6. 2. 1902; Brandenburg, 6. 12. 1912; Neddemmin, Kr. Stargard. 8. 7. 1920.) 85
— — und **Hans-Günther Kroneberg,** Über das sympathicomimetische pressorische Prinzip des Harns. Mit 7 Textabbildungen. (Stolberg in Rhld., 6. 2. 1902; Brandenburg, 6. 12. 1912; Wittenberge, 24. 8. 1919.) 228
Hotovy, Rudolf, Über die Wirkung verschiedener galletreibender Mittel auf die Diurese der Ratte. (Außig 15. 7. 1914.) 758
— s. **Gustav Kuschinsky** und **Hedwig Langecker.**
Jung, Fritz, Studien über Methämoglobinbildung. XXIX. Mitteilung. Chlor- und Amino-Nitrobenzole. Mit 2 Textabbildungen. (Friedrichshafen, 21. 4. 1915.) 133
— Zur Pathologie der roten Blutkörperchen. II. Mitteilung. Wirkungen einiger Metallsalze. Mit 19 Textabbildungen. (Friedrichshafen, 21. 4. 1915.) 139
— Zur Theorie der Chloratvergiftung. III. Mit 5 Textabbildungen. (Friedrichshafen, 21. 4. 1915.) 157
— Zur Pathologie der roten Blutkörperchen. IV. Mitteilung: Über die hämolytische Wirkung des Arsenwasserstoffes. Mit 10 Textabbildungen. (Friedrichshafen, 21. 4. 1915.) 604
— und **Peter Witt,** Studien über Methämoglobinbildung. XXX. Mitteilung. Versuche mit Polyphenolen. Mit 4 Textabbildungen. (Friedrichshafen, 21. 4. 1915; Berlin, 20. 10. 1918.) 426
— — Die Wirkung der Phenole auf den Blutdruck. Mit 1 Textabbildung. (Friedrichshafen, 21. 4. 1915; Berlin, 20. 10. 1918.) 437
Junkmann, Karl, Emil Starkenstein †. Mit 1 Textabbildung. (Leitmeritz, 27. 5. 1897.) 13
Keeser, Eduard, Über das Wesen der Cholesterinolyse. (Wuppertal-Elberfeld, 27. 6. 1892.) 36
Kiese, Manfred, Empfindliche photometrische Verfahren zur Bestimmung von Hämiglobin und Hämoglobin. Mit 8 Textabbildungen. (Stettin, 28. 6. 1910.) 190
— Die Reduktion des Hämiglobins. IV. Mitteilung. Die katalytische Wirkung einiger Farbstoffe auf die Reduktion des Hämiglobins in roten Zellen. Mit 13 Textabbildungen. (Stettin, 28. 6. 1910.) 288

Seite

Kiese, Manfred, Darstellung und Eigenschaften von Verdoglobinen. Mit 9 Textabbildungen. (Stettin, 28. 6. 1910.) 385

— Darstellung und Eigenschaften von Verdoglobinen. II. Mitteilung. Zur Konstitution des Verdoglobin NO_2. Mit 4 Textabbildungen. (Stettin, 28. 6. 1910.) 439

— Die Reduktion des Hämiglobins. V. Mitteilung. Beschleunigung durch Erhöhung der Milchsäurekonzentration des Blutes. (Stettin, 28. 6. 1910.) 451

— s. **Klaus Blömer.**

— s. **Wolfgang Heubner, Margarete Stuhlmann** und **Waltraud Schwartzkopff-Jung.**

— und **Waltraud Schwartzkopff,** Die Reduktion des Hämiglobins. III. Mitteilung. Reduktion des Hämiglobins und Stoffwechsel in roten Zellen. Mit 13 Textabbildungen. (Stettin, 28. 6. 1910; Varchentin i. Mecklbg., 23. 6. 1921.) 267

Knebel, Rudolf, Über die Kreislaufwirkung des Peripherins. I. Mitteilung. Mit 6 Textabbildungen. (Berlin-Wilmersdorf, 13. 5. 1910.) 615

Koch, Ruprecht s. **Peter Marquardt.**

Kroneberg, Hans-Günther s. **Peter Holtz** und **Karl Credner.**

Küchmeister, Heinrich, Über die Wirkung des Nikotinsäureamids bei der Methylalkoholvergiftung der Ratte. (Hamburg, 21. 1. 1918.) 555

— Nachtrag zu der Arbeit „Über die Wirkung des Nikotinsäureamids bei der Methylalkoholvergiftung der Ratte". (Hamburg, 21. 1. 1918.) . . 763

Kühn, Hans Adolf s. **Josef Peter Pichotka.**

Kuschinsky, Gustav und **Hedwig Langecker,** Diurese, Filtration und Sekretion der Niere unter den Einfluß verschiedener Pharmaka. I. Mitteilung. Der Einfluß der intravenösen Infusion auf die Grunddiurese des Hundes. (Berlin, 10. 1. 1904; Schluckenau, 29. 1. 1894.) 699

— — Diurese, Filtration und Sekretion der Niere unter dem Einfluß verschiedener Pharmaka. II. Mitteilung. Die Filtration der Niere des Hundes unter verschiedenen Belastungen. (Berlin, 10. 1. 1904; Schluckenau, 29. 1. 1894.) 710

— — Diurese, Filtration und Sekretion der Niere unter dem Einfluß verschiedener Pharmaka. III. Mitteilung. Über den Einfluß des Atropins auf die Nierenfunktion des Hundes einschließlich Sekretion des Phenolrots. (Berlin, 10. 1. 1904; Schluckenau, 29. 1. 1894.) 718

— s. **Hedwig Langecker.**

— — und **Rudolf Hotovy,** Diurese, Filtration und Sekretion der Niere unter dem Einfluß verschiedener Pharmaka. VI. Mitteilung. Die Wirkung von Testosteron auf Wasser- und Chloridausscheidung bei Ratte und Hund. (Berlin, 10. 1. 1904; Schluckenau, 29. 1. 1894; Außig, 15. 7. 1914.) . . 752

Langecker, Hedwig und **Gustav Kuschinsky,** Diurese, Filtration und Sekretion der Niere unter dem Einfluß verschiedener Pharmaka. IV. Mitteilung. Einfluß des Atropins auf Wasser- und Chloridausscheidung der Ratte bei verschiedenen Belastungen. (Schluckenau, 29. 1. 1894; Berlin, 10. 1. 1904.) 738

— — Diurese, Filtration und Sekretion der Niere unter dem Einfluß verschiedener Pharmaka. V. Mitteilung. Die diuretische Wirkung organischer Quecksilberverbindungen bei Hund, Ratte und Maus unter dem Einfluß des Atropins. (Schluckenau, 29. 1. 1894; Berlin, 10. 1. 1904.) 742

— s. **Gustav Kuschinsky.**

— s. **Gustav Kuschinsky** und **Rudolf Hotovy.**

Seite

Lübken, Wulf, Die Wirkung des Insulins auf Balbusdruck und Quaddelresorptionszeit. Mit 1 Textabbildung. (Stralsund, 27. 11. 1920.) 689

— s. **Gerhard Mohnike.**

Lüdde, Else Doris s. **Leopold Ther.**

Lummer, H. D. s. **H. Bergstermann.**

Marquardt, Peter und **Ruprecht Koch,** Die Blutdruckwirkung des Protocatechualdehyds der Protocatechusäure und des Vanillins. Ein Beispiel für die Bedeutung der 1-, 3-, 4-Substitution am Benzolkern für die Blutdruckwirkung des Adrenalins. Mit 12 Textabbildungen. (Berlin-Wilmersdorf, 8. 10. 1910; Berlin-Wilmersdorf, 12. 12. 1915.) 558

Matthes, Karl s. **Fr. Groß.**

Mehmke, Siegfried s. **Leopold Ther.**

Mohnike, Gerhard und **Wulf Lübken,** Zur Frage der Kohlehydratstoffwechselwirkung des Kallikreins. (Wiesbaden, 6. 1. 1918; Stralsund, 27. 11. 1920.) 543

Müller, Dagobert s. **Erich Vincke.**

Nachtrag zum Verzeichnis wissenschaftlicher Schriften von Emil Starkenstein † 763

Paulus, Walter, Über die Verteilung von Thallium bei Vergiftungen. Mit 1 Textabbildung. (München, 12. 8. 1907.) 186

Pichotka, Josef Peter und **Hans Adolf Kühn,** Experimentelle und morphologische Untersuchungen zur Sauerstoffvergiftung. Mit 1 Textabbildung. (Gelsenkirchen, 7. 11. 1911; Rostock, 24. 10. 1914.) 336

Repke, Kurt s. **Paul Wels.**

Ruska, Helmut, Über die Bindung des Sublimats an Bakterien und Virus. Mit 9 Textabbildungen. (Heidelberg, 7. 6. 1908.) 765

Schimert, Gustav jr., Experimentelle Untersuchungen über die Kreislaufveränderungen bei Myokardinfarkt und ihre Bedeutung für die Therapie. Mit 9 Textabbildungen. (Budapest, 28. 11. 1910.) 473

Schümmelfeder, Norbert, Untersuchungen über Cholinesterase im Blut nach experimentellen Schädigungen. I. Mitteilung. Bestimmungsmethode und Einfluß von Narkose, operativen Eingriffen und Blutentnahmen. Mit 9 Textabbildungen. (Neuenkirchen in Oldbg., 9. 11. 1916.) 454

— Untersuchungen über Cholinesterase im Blut nach experimentellen Schädigungen. II. Mitteilung. Das Verhalten der Cholinesterase in Vollblut und Serum bei experimenteller Erfrierung. Mit 3 Textabbildungen. (Neuenkirchen in Oldbg., 9. 11. 1916.) 467

— Untersuchungen über Cholinesterase im Blut nach experimentellen Schädigungen. III. Mitteilung. Verhalten der Cholinesterase im Blut von Hunden bei experimenteller Verbrennung. Mit 3 Textabbildungen. (Neuenkirchen in Oldbg., 9. 11. 1916.) 567

— Untersuchungen über Cholinesterase im Blut nach experimentellen Schädigungen. IV. Mitteilung. Das Verhalten der Cholinesterase im Blutserum nach örtlicher Verbrennung. Mit 3 Textabbildungen. (Neuenkirchen in Oldbg., 9. 11. 1916.) 626

Schwartzkopff, Waltraud s. **Manfred Kiese.**

Schwartzkopff-Jung, Waltraud s. **Wolfgang Heubner, Manfred Kiese** und **Margarete Stuhlmann.**

Stuhlmann, Margarete s. **Wolfgang Heubner, Manfred Kiese** und **Waltraud Schwartzkopff-Jung.**

Seite

Ther, Leopold, Beiträge zum Problem des Wirkungswandels. I. Mitteilung. Beobachtungen über inverse Barium- und Papaverinwirkungen an glattmuskeligen Organen. Mit 3 Textabbildungen. (Wien, 19. 4. 1909.) 98

— Froschherzversuche mit rasch variablen Kohlensäure-Bikarbonatgemischen. Mit 2 Textabbildungen. (Wien, 19. 4. 1909.) 571

— und **Else Doris Lüdde,** Über die Wirkung des Hydrochinons und seiner Oxydationsprodukte auf den überlebenden Kaninchendarm. Mit 7 Textabbildungen. (Wien, 19. 4. 1909; Weimar, 8. 5. 1921.) 41

— und **Siegfried Mehmke,** Beiträge zum Problem des Wirkungswandels. II. Mitteilung. Untersuchungen über die Abhängigkeit der Adrenalinwirkung von Bewegungsform und Tonuslage der Uterusmuskulatur. Mit 6 Textabbildungen. (Wien, 19. 4. 1909; Stöckelheim, Kr. Northeim, 1. 10. 1919.) 414

Vincke, Erich, Untersuchungen über Thromboseprophylaxe mit organischen Salzen seltener Erden. III. Mitteilung. Die thromboseverhütende Wirkung des Neodymnicotinats. Mit 2 Textabbildungen. (Mettmann im Rhld., 24. 8. 1905.) 497

— und **Dagobert Müller,** Zur Frage der narkotischen Wirkung von Steroidhormonen. (Mettmann im Rhld., 24. 8. 1905; Neuefehn, Ostfriesland, 31. 10. 1921.) 446

Weißbecker, Ludwig, Substanz P im Blut. Ein Beitrag zum Spätgiftproblem. Mit 3 Textabbildungen. (Mainz, 19. 3. 1915.) 674

Wels, Paul und **Kurt Repke,** Über den Einfluß der Sulfhydrilgruppe auf die Cholinesterase (Binnenwalde i. Ostpr., 2. 2. 1890; Friesack i. d. Mark, 17. 6. 1919.) 323

Welter, S. s. **J. Decristoforo.**

Witt, Peter s. **Fritz Jung.**

Zipf, Hans Friedrich, Über den Einfluß der Kohlensäure auf das Wachstum von Bact. coli unter verschiedenen Vegetationsbedingungen. Mit 4 Textabbildungen. (Oberkirch in Baden, 16. 2. 1911.) 631

An unsere Leser und Mitarbeiter!

Der langjährige Herausgeber dieses Archivs, WALTHER STRAUB, weilt nicht mehr unter den Lebenden. Ehe er die $2^1/_2$jährige Unterbrechung im Erscheinen dieser Hefte, ehe er die schwere Zerstörung seines Instituts und den endgültigen Zusammenbruch seines Vaterlandes erlebte, erlag er einem gnädigen Geschick in der Nacht zum 22. Oktober 1944. Zahllose Fachgenossen in der weiten Welt beklagen den Verlust dieses hervorragenden Mannes, dessen Tätigkeit auf allen Gebieten von größtem Erfolg gekrönt war, wovon auch die vielen Bände des Archivs in den vergangenen Jahrzehnten Zeugnis ablegen.

Im Andenken an ihn und im Sinne seines Werkes nehmen wir die Arbeit wieder auf, die den Fortbestand dieses ehrwürdigen Erbes von NAUNYN und SCHMIEDEBERG sichern soll. Wir bitten alle Kollegen, die auf dem Gebiete der Pharmakologie und experimentellen Pathologie arbeiten, dies Erbe weiterhin zu pflegen und wie früher zu fördern, nicht nur durch Einsendung bedeutender Arbeiten, sondern auch durch deren kritische, knappe und sprachlich saubere Fassung.

Die ersten nun erscheinenden Hefte bringen zunächst eine Reihe von Arbeiten, die noch von STRAUB in Empfang genommen wurden und infolge der Ungunst der äußeren Umstände erst so spät zur Veröffentlichung kommen.

Die Schriftleitung. *Der Verlag.*

Walther Straub †.

Walther Straub wurde geboren am 8. Mai 1874 zu Augsburg. Er studierte Medizin in München, Straßburg und Tübingen. Noch als Student veröffentlichte er seine erste, unter Schmiedeberg ausgeführte Arbeit. Nach dem Staatsexamen in München arbeitete er bei Carl Voit und vertrat kurze Zeit einen Landarzt. 1898 promovierte er mit einer durch Jodlbauer angeregten Arbeit. 1900 wurde er Assistent bei Rudolf Boehm in Leipzig, wo er sich 1904 habilitierte. Schon 1905 erhielt er einen Ruf als ordentlicher Professor nach Marburg, 1905 nach Würzburg, 1907 nach Freiburg, 1923 nach München. 1927 erhielt er den philosophischen Ehrendoktor in Marburg, 1937 den juristischen in Kalkutta. Er starb am 22. Oktober 1944 in Bad Tölz.

Mit Walther Straub ist ein *geistiger Mensch* im wahrsten Sinne des Wortes von uns gegangen. So menschlich schmerzhaft seinen Freunden und Schülern dieser Verlust ist, für einen Mann von der Persönlichkeitsgröße Straubs gilt weder der alltägliche Satz von der unausfüllbaren Lücke, noch von der Ersetzbarkeit eines jeden. Sein Werk und sein Geist werden über uns hinausleben und wirksam sein. Er war nicht nur Pharmakologe, sondern hatte seine ureigenste Anschauung über alle Fragen der Medizin, der Naturwissenschaften und darüber hinaus des Geistes überhaupt. Man mußte ihn erst genauer kennen, ehe sich einem diese köstliche Seite seines Wesens offenbarte.

Walther Straub war einer der Menschen, der neben der *Genialität des Geistes* die so überaus seltene *Genialität des Herzens* besaß, deren Absterben den Kältetod der Menschheit bedeuten würde. Dieses wunderbare Erbe zu pflegen und kommenden Geschlechtern weiter zu reichen, erscheint mir als eine der schönsten Pflichten der jüngeren Generation.

Hinter einer fast rauhen und scheinbar abweisend wirkenden Außenseite lebte ein grundgütiges und sehr feinfühliges Herz.

Im täglichen Umgang war Straub äußerst wortkarg und nur am Barometer der unvermeidlichen Zigarre konnte man erkennen, was er ausdrücken wollte. Wenn er aber etwas sagte, dann traf er den Nagel auf den Kopf.

Die künstlerische Grundart seines Wesens offenbarte sich nicht nur in seinen außerberuflichen Interessengebieten, sondern trat vor allen Dingen auch in seinen wissenschaftlichen Methoden in Erscheinung, die durch ihre Einfachheit und Eleganz immer wieder bestechend wirkten. Er gehörte zu den *großen Meistern* des Experimentes, die alle wesentlichen Versuche schon aus Freude am guten Versuch selbst anstellen.

Als Lehrer hatte Straub einen sehr gesunden Grundsatz, dem er selbst einmal bei der Feier seines 60. Geburtstages im engen Kreise mit folgenden

Grant

Worten Ausdruck verlieh: „Es ist immer mein Bestreben gewesen, ‚Schüler', aber nie eine Schule zu haben. Wenn ein Neuer kam, dann habe ich den Frosch ins Wasser geworfen, schwimmen mußte er selber." Es spricht daraus seine hohe Achtung vor der Persönlichkeit des Anderen. Aus dem gleichen Grunde hat er außer Doktoranden kaum je einem Mitarbeiter ein Thema zur Bearbeitung gegeben.

Es mag sein, daß dieser höhere Gesichtspunkt einer geistigen Persönlichkeitserziehung manchmal nicht ganz verstanden bzw. als Mangel an Hilfsstellung empfunden worden ist, wobei wohl selten an die Hilflosigkeit nach dem Wegfall der stützenden Krückstöcke des „geistigen Vaters" gedacht wurde. Seine Hilfen waren bewußt unmerklicher Art. Auf diese Art gelang es ihm, die Freude am eigenen Schaffen und der Verantwortlichkeit bei seinen Mitarbeitern zu wecken und zu erhalten. Diese gleiche hohe Auffassung vom Menschentum fand ihren Ausdruck in Straubs außerordentlicher Pünktlichkeit. Er besaß kein Vor- oder Wartezimmer. Ohne Ansehung der Stellung usw. brauchte niemand auf ihn zu warten. Wenn wahre Erziehung nur durch rechtes Vorleben erreicht wird, so hat Straubs wortloses Beispiel eine außerordentliche Wirkung auf alle ausgeübt, die mit ihm in Berührung gekommen sind.

Wenn ich dem *Menschen* Straub einen so weitgehenden Raum gewidmet habe, so geschah das bewußt in Ansehung der ungemeinen Bedeutung dieser Haltung für die Gegenwart und vor allen Dingen für die Zukunft.

Außerordentlich ernst nahm er den Unterricht. Seine Vorlesung war immer ein hoher Genuß. Straub hat niemals improvisiert, wenn auch dieser Eindruck bei der Leichtigkeit und Eleganz, mit der er las, entstehen konnte. Ein bis zwei Stunden vor dem Kolleg war er daher für niemand zu sprechen. Außerdem überzeugte er sich immer persönlich, daß die Vorlesungsversuche richtig vorbereitet waren und ließ es nie zu, daß auf irgendeine Art „nachgeholfen" wurde. Auch hier wollen wir in seinem Geiste der Vereinigung von Forschung und Lehre weiterdienen.

Der Name des Gelehrten Walther Straub war einer der bekanntesten in der ganzen Welt. Es war immer eine Freude, die Achtung und Verehrung zu beobachten, mit der man ihm im Auslande begegnete, gerade weil er sich so gab wie er war. So hat er z. B. auch in England auf nationalen Kongressen seine Diskussionsbemerkungen in deutscher Sprache gemacht. Gemessen an der langen Zeit, die er als Gelehrter schaffte, hat Straub nicht viel geschrieben, aber was er veröffentlichte, verblüffte immer wieder durch die *intuitive Sicherheit*, mit der er ein Problem erfaßte.

Charakteristisch für Straub war seine enge Beziehung zur *Physiologie*. So übertrug er frühzeitig die Gesetze der Herzdynamik seines Freundes Otto Frank auf die Wirkung der Digitalisglykoside am Froschherzen. Darüber hinaus registrierte er am Katzenherzen mit dem Troikartmano-

meter den intraventrikulären Druckablauf vor und nach Digitalis. Eine hohe Freude bereitete es ihm, als er die Entdeckung der Steroidnatur der Digitaliskörper erfuhr. Er hatte überhaupt ein besonderes Empfinden für die chemischen Feinheiten der Pharmaka, wie dies die Aufdeckung der Glykosidnatur der Anthrazenderivate der Folia Sennae beweist. Die pharmakologische Analyse ihres Einflusses auf die Darmperistaltik war seine letzte größere tierexperimentelle Arbeit, die in ihrer Art ein echtes Meisterstück Straubscher Experimentierkunst darstellt.

Das Straubsche Froschherzpräparat war eine Art pharmakologisches Kolumbusei. Er hat mit Recht immer darauf hingewiesen, daß dieses technisch einfache Präparat physiologisch-pharmakologisch sehr schwer zu handhaben sei, weil die *üblichen* Anwendungsmethoden ständig die Grundbedingungen änderten, so daß vergleichbare Ergebnisse auf diese Art kaum zu erhalten seien.

Am interessantesten und gegenwärtig am meisten umstritten ist seine *Potentialgifttheorie*, wie er sie am Wirkungsmechanismus des Muskarins mit dem Atropinantagonismus und der Adrenalinwirkung studiert hat. Allein seine Art der Darstellung ist so klassisch schön, daß die daraus entsprungene heuristische Anregung an sich schon so wertvoll ist, daß sich jede Bemühung darum lohnt. Charakteristisch ist bei diesen Arbeiten eine Besonderheit Straubs, daß sie vor 40 Jahren entstanden, wo diese Dinge *nicht aktuell* waren. Er hatte ihre Bedeutung wohl erkannt, aber von sich aus nichts dazu getan, weil er sehr wohl wußte, „Gut Ding will Weile haben". Deshalb wollen wir auch hier der Zukunft die Entscheidung überlassen, wer „recht" hat oder nicht.

Gemeinsam mit Willstätter führte er den Tribromäthylalkohol, das *Avertin*, als erstes *parapulmonales* Narkotikum ein. Als er die Gefahren der Vollnarkosen mit diesem nicht steuerbaren Körper erkannt hatte, schuf er den Begriff der *Basisnarkose*. Gemeinsam mit seinem Freunde Friedrich v. Müller hat er zahlreiche klinische Fragen erörtert, denn sein Interesse in dieser Richtung war größer, als man anzunehmen geneigt war.

Es kann hier nicht meine Aufgabe sein, Straubs wissenschaftliches Lebenswerk zu schildern bzw. zu würdigen, denn das spricht viel eindeutiger und klarer aus seinen Arbeiten. Der menschlich großen und eigenartigen Persönlichkeit entsprach seine Qualität als Gelehrter, auch hier war er im höchsten Grade originell und einmalig.

Straub war *außerordentlich fleißig*, er hat weit mehr erarbeitet als veröffentlicht. Die Leichtigkeit und Eleganz seines Vortrages konnte den Eindruck erwecken, als ob die vorangehende Arbeit vom selben Charakter gewesen sei, das war aber durchaus nicht der Fall.

Ein besonderes Verdienst Straubs war die Gründung der *„Deutschen pharmakologischen Gesellschaft"*, durch die er die Eigenständigkeit und Wichtigkeit unseres Faches kundtun wollte. Zudem war ihm klar, daß

der Zusammenschluß der deutschen Pharmakologen als Kristallisationskern nach innen und außen wirken mußte. Genau denselben Wirkungswert trug seine redaktionelle Arbeit an diesem Archiv.

Die deutschen Pharmakologen sind stolz, einen Straub zu einem ihrer Besten zählen zu dürfen und werden die innere Verpflichtung, die daraus entspringt, in seinem Geiste zu leben und zu arbeiten, nach ihren besten Kräften zu erfüllen trachten.

Hans Gremels, Marburg.

Verzeichnis der Arbeiten von Walther Straub †.

Straßburg:

1. Über die Bedingungen des Auftretens der Glykosurie nach der Kohlenoxydvergiftung. Aepp. **38**, 139—157 (1897).

München, Physiol. Inst.:

2. Über den Einfluß des Kochsalzes auf die Eiweißzersetzung. Z. Biol. **37**, 527—549 (1899). Inaug. Diss. München 1899.

3. Über den Einfluß der Wasserentziehung auf den Stoffwechsel und Kreislauf. Z. Biol. **38**, 537—566 (1899).

Leipzig:

4. Über das Verhalten des Hamamelitannins im Säugetierkörper. Aepp. **42**, 1—9 (1899).

5. Zur Muskelphysiologie des Regenwurms. Pflügers Arch. **79**, 379—399 (1900).

6. Ein neues Kymographion mit Antrieb durch Elektromotor. Pflügers Arch. **81**, 574—583 (1900).

7. Toxische Untersuchungen an Selachierherzen. Z. Biol. **42**, 363—376 (1901). Jubelbd. für C. Voit.

8. Über die Wirkung des Antiarins am ausgeschnittenen, suspendierten Froschherzen. Aepp. **45**, 346—379 (1901).

9. Über die Wirkung der Kohlensäure am ausgeschnittenen suspendierten Froschherzen. Aepp. **45**, 380—388 (1901).

10. Zur Physiologie des Aplysienherzens. Pflügers Arch. **86**, 504—532 (1901).

11. Pharmakologische Studien über die Substanzen der Filixsäuregruppe. Aepp. **48**, 1—47 (1902).

Neapel:

12. Quantitative Untersuchung des Eindringens von Alkaloiden in lebende Zellen. Pflügers Arch. **98**, 233—240 (1903).

Leipzig:

13. Quantitative Untersuchungen über das Eindringen von Alkaloiden in lebende Zellen. Ein Beitrag zur Kenntnis des Mechanismus der Alkaloidwirkung. Arch. Fisiol. (It.) **1**, 55—78 (1903).

14. Eine einfache Methode des Nachweises von Phosphor in Phosphorölen für klinische Zwecke. Münch. med. Wschr. **1903 II**, 1145.

15. Über eine neue Methode des quantitativen Nachweises von Phosphor in öliger Lösung. Dtsch. Arch. Pharmazie **24**, 335—340 (1903).

16. Beobachtungen und Versuche über Reaktionen zwischen gelbem Phosphor und Kupfer in wäßriger Lösung. Z. anorg. Chem. **35**, 460—473 (1903).

17. Über chemische Vorgänge bei der Einwirkung von Licht auf fluoreszierende Substanzen (Eosin und Chinin und die Bedeutung dieser Vorgänge für die Giftwirkung). Münch. med. Wschr. **1904 II**, 1093—1096.

18. Versuche und Bemerkungen zur Theorie der Urethanwirkung. Arch. scs. biol. St. Petersburg Suppl. **11**, 49—54 (1904). Ref. Malys Jahresbericht **36**, 123 (1906).
19. Erwiderung an Brandenburg. Z. klin. Med. **54**, 161, 162 (1904).
20. Über den Chemismus der Wirkung belichteter Eosinlösung auf oxydable Substanzen. Aepp. **51**, 383—390 (1904).

Neapel:
21. Beiträge zur physiologischen Methodik mariner Tiere. 1. Aplysia. Mitt. zool. Stat. Neapel **16**, 458—468 (1904).
22. Fortgesetzte Studien am Aplysienherzen (Dynamik, Kreislauf und dessen Innervation), nebst Bemerkungen zur vergleichenden Muskelphysiologie. Pflügers Arch. **103**, 429—449 (1904).

Leipzig:
23. Mit E. Wedekind: Über die Einführung von Stickstoff in die Santoninmolekel und das physiologische Verhalten einiger Santoninstoffe. Z. physiol. Chem. **43**, 240 bis 248 (1904/05).
24. Dynamik des Froschherzventrikels bei nicht tödlicher Digitalisvergiftung. Z. exper. Path. u. Ther. **1**, 489—512 (1905).

Marburg:
25. Mechanismus der Muskarinwirkung am Herzen und der Antagonismus Atropin-Muskarin. Zbl. Physiol. **19**, 302—304 (1905).
26. Mit Rich. Rhodius (Leipzig und Marburg): Studien über die Muskarinwirkung am Froschherzen bei erhaltenem Kreislauf, besonders über die Natur des Tetanus des Herzens im Muskarinzustand und die der negativ inotropen Wirkung auf die Herzmuskelzuckung. Pflügers Arch. **110**, 492—512 (1905).
27. Mit E. Wedekind: Beiträge zur Kenntnis des Santonins. Arch. Pharmaz. **244**, 623—639 (1906).
28. Verfahren zur Herstellung haltbarer Lösungen der wirksamen Nebennierensubstanz. (Gegen die Oxydation Aldo- und Ketoalkalidisulfide. Am besten Azetonnatriumbisulfit.) Pat. CC **1906 I**, 1859.
29. Zur chemischen Kinetik der Muskarinwirkung und des Antagonismus Muskarin-Atropin. Pflügers Arch. **119**, 127—151 (1907).

Würzburg:
30. Ein einfacher Apparat zur Unterhaltung der künstlichen Atmung an Versuchstieren. Pflügers Arch. **119**, 549—552 (1907).
31. Mechanismus der Adrenalinwirkung und die mögliche Bedeutung der Substanz für den Kreislauf, nach Versuchen von W. Kretschmer. Sitz.ber. physikal.-med. Ges. Würzburg **1907**, 80, 81.
32. Die Elementarwirkung der Digitaliskörper. Sitz.ber. physik.-med. Ges. Würzburg. **1907**, 85—93.

Freiburg:
33. Gift und Organismus. Antrittsrede Freiburg i. Br. 26. 2. 1908.
34. Die Pyrenolfrage von einer ganz anderen Seite. Münch. med. Wschr. **1908 II**, 2448.
35. Einführung zu Poulsson, Lehrbuch der Pharmakologie. Leipzig 1909.
36. Über den Mechanismus der Adrenalinglykosurie. Münch. med. Wschr. **1909 I**, 493, 494.
37. Registrierung vasokonstriktorischer Wirkung durch das Saitengalvanometer. Arch. Fisiol. (It.) **7**, 411, 412 (1909).
38. Physiologische Wertbestimmung von Drogen, speziell der Folia Digitalis. Münch. med. Wschr. **1910 II**, 1141, 1142.
39. Quantitative Untersuchungen über den Chemismus der Strophanthinwirkung. Biochem. Z. **28**, 392—407 (1910).

40. Über chronische Vergiftungen, speziell die chronischen Bleivergiftungen. Dtsch. med. Wschr. **1911 II**, 1469—1471.

41. Le tonus musculaire dans la physiologie et la pathologie de l'organe de la vue. Bull. belge Ophtalm. **29**, 98. Ref. Zbl. Biochem. und Biophysik **12**, 26 (1911/12).

42. Vorlesungsversuche zur Theorie der Narcose. Z. biol. Technik u. Methodik **2**, 7 (1912).

43. Die Bedeutung der Zellmembran für die Wirkung chemischer Stoffe im Organismus. Naturw. Rdsch. **27**, 621—624 (1912). (Vortr. 84. Verslg. Natf. Ae. Münster.)

44. Das elektromotorische Verhalten der Gifte der Muskarin- und Atropingruppe am Froschherzventrikel. Zbl. Physiol. **26**, 990—993 (1912).

45. Die pharmakodynamische Wirkung des Narkotins im Opium. Biochem. Z. **41**, 419—430 (1912).

46. Mit L. Hermanns: Toxikologische Untersuchungen am bioelektrischen Strome. I. u. III. Mitt. Z. Biol. **58**, 251 —261 (1912).

47. Narcophin, ein rationelles Opiumpräparat. Münch. med. Wschr. **1912 II**, 1542 bis 1543.

48. Bemerkungen zu der Untersuchung von Dr. H. F. Grünwald: Zur Frage der Digitalisspeicherung im Herzen. Aepp. **71**, 139 (1913).

49. Über die Gefährlichkeit der Kombinationen von Morphin mit allgemeiner Narcose und mit Schlafmitteln. Münch. med. Wschr. **1913 II**, 1823.

50. Über Zersetzung und Konservierung von Skopolaminlösung. Münch. med. Wschr. **1913 II**, 2279, 2280.

51. Über die Beeinflussung der Morphinwirkung durch die Nebenalkaloide des Opiums. Bemerkungen zu der gleichlautenden Arbeit von R. Meissner in Naunyn-Schmiedebergs Arch. **54**, 395ff. Biochem. Z. **57**, 156—160 (1913).

52. Das Projectionskymographion mit Kurvenkino. Z. biol. Technik **3**, 88 (1913).

53. Herstellung des Kurvenmaterials für den Kurvenkino. Z. biol. Technik **3**, 267 1913).

54. Verfahren zur Darstellung haltbarer Skopolaminlösungen. Pat. CC **1913 II**, 1718. (Zusatz zu frisch hergestellten Skopolaminlösungen von höher molekularen mehrwertigen Alkoholen, wie Erythrit, Arabit, Mannit, Dulzit, Sorbit u. dgl.)

55. Verfahren zur Herstellung haltbarer Skopolaminlösungen. Pat. CC **1914 II**, 448. (Es wurde gefunden, daß auch die Zucker, z. B. Dextrose, Fructose, Lävulose u. dgl. eine haltbar machende Wirkung auf Skopolaminlösung ausüben.)

56. Nachträgliche Berichtigung zu meiner Arbeit : Quantitative Untersuchungen über den Chemismus der Strophanthinwirkung. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **28**, 392 (1910). Biochem. Z. **59**, 496, 497 (1914).

57. Sparsam mit Überseedrogen. Münch. med. Wschr. **1914 II**, 2018.

58. Experimentelle Untersuchungen über Wesen und Aussicht der Tetanustherapie mit $MgSO_4$. Münch. med. Wschr. **1915 I**, 25.

59. Tetanustherapie mit Magnesiumsulfat (Erfahrungen am tetanuskranken Menschen bei i.v. Einführung). Münch. med. Wschr. **1915 I**, 341.

60. Chemischer Bau und pharmakologische Wirksamkeit in der Digitalisgruppe. Biochem. Z. **75**, 132—144 (1916).

61. Digitaliswirkung am isolierten Vorhof des Frosches. (Nach Versuchen von S. Yagi.) Aepp. **79**, 19—29 (1916).

62. Die Mengen der wirksamen Bestandteile in Digitalissamen und Digitalisblatt. Zur Kritik von Digitalisinfus und Digitaliszubereitungen. Aepp. **80**, 52—71 (1917).

63. Über Messung der Resorbierbarkeit von Digitalisglykosiden. Aepp. **80**, 72—76 **(1917).**

64. Digitalisblatt und pharmazeutische Digitalispräparate in quantitativer Zusammensetzung. Münch. med. Wschr. **1917 I**, 513.
65. Über Digitaliskultur. Arch. Pharmaz. **255**, 198 (1917).
66. Über die Entwicklung der typischen Blattglykoside in der keimenden und wachsenden Digitalispflanze. Biochem. Z. **82**, 48—59 (1917).
67. Die Mengen der digitalisartig wirkenden Substanzen im Oleanderblatt und die Art ihres natürlichen Vorkommens (Tannoidfrage). Aepp. **82**, 327—343 (1918).
68. Mit L. Krehl: Über Verodigen (Gitalin). Dtsch. med. Wschr. **1919 I**, 281—283.
69. Die Reversibilität der K-Strophanthinwirkung am Herzen. Ber. pharmaz. Ges. **29**, 79—88 (1919).
70. Über die Resistenz der Ratten gegen K-Strophanthin. Aepp. **84**, 223—233 (1919).
71. Toxikologische Untersuchungen des M. Fickerschen Gasbrandtoxins und Antitoxins. Münch. med. Wschr. **1919 I**, 89—91.
72. Vom Schlafen, Rauchen und Kaffeetrinken. Z. ärztl. Fortbild. **17**, 136—138 (1920).
73. Das Problem der physiologischen Salzlösung in Theorie und Praxis. Münch. med. Wschr. **1920 I**, 249—251.
74. Naturwissenschaften und Pharmakologie im medizinischen Unterricht. Dtsch. med. Wschr. **1920 I**, 246, 247, 270, 271, 300, 301.
75. Zur Pharmakologie der hinteren Lymphherzen des Frosches. Aepp. **85**, 123—136 (1920).
76. La Escila y su Principio activo „Escillareno", 1921/22?
77. Über einen vereinfachten Weg der Ableitung von Elektrokardiogrammen. Klin. Wschr. **1922 II**, 1638.
78. Erwiderung gegen einen Einwand von H. Sachs (Klin. Wschr. **1922 II**, 2383) betr. Ableitung von subcutan eingestochenen Nadelelektroden. Klin. Wschr. **1922 II**, 2383.
79. Über Digitalisstoffe und Digitalismedikamente. Dtsch. med. Wschr. **1922 I**, 791—793.
80. Mit R. Willstätter u. A. Hauptmann: Über Voluntal, ein neues Schlafmittel. Münch. med. Wschr. **1922 II**, 1651—1654.
81. Die Stellung der Balneologie zur Pharmakologie. Internat. Ärztl. Fortbildungskurs Balneologie u. Balneotherapie. Karlsbad 1922. Karlsb. ärztl. Vortr. **4**, 92—104 (1923).
82. Kinematographische Reproduktion graphischer Registrierungen (Kurvenkino). In Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Bd. I/1, 2. Teil, S. 353—359, Liefg 96. 1923.
83. Die Stellung der Balneologie zur Pharmakologie. Abdruck aus Internat. Ärztl. Fortbild.kurs 1922.
München:
84. Wie läßt sich die ärztliche Behandlung der Kranken angesichts der jetzigen wirtschaftlichen Notlage der Bevölkerung sparsam und doch sachgemäß gestalten. Ärztl. Ver.bl. **53**, 98, 99 (1924).
85. Zur therapeutischen Beherrschung des Oleum Chenopodii. Klin. Wschr. **1924 II**, 1993.
86. Mit C. v. Rad: Über entbittertes Veronal (Paranoval). Dtsch. med. Wschr. **1924 I**, 329, 330.
87. Die Digitalisgruppe. Handbuch der experimentellen Pharmakologie, herausgeg. von Heffter, Bd. II, 2, S. 1355—1452. 1924.
88. Die Filixgruppe. Handbuch der experimentellen Pharmakologie, herausgeg. von Heffter, Bd. II/2, S. 1548—1562. 1924.
89. Rudolf Gottlieb. Nachruf. Münch. med. Wschr. **1924 II**, 1757.
90. Mit J. Schüller: Neue Prüfungsordnung und Physiologie. Klin. Wschr. **1925 II**, 1798.

91. Arthur Heffter, Nachruf. Aepp. **105**, I—IV (1925).
92. Bernhard Naunyn. Aepp. **107**, 128a (1925).
93. Mit W. Gaede: Ein Laboratoriumsapparat zur schonenden Schnelltrocknung leicht zersetzlicher Lösungen. Biochem. Z. **165**, 247—249 (1925).
94. Wertbestimmungen von Schilddrüsenpräparaten. Dtsch. med. Wschr. **1925 I**, 4—5.
95. Über die Mystik der kleinen Arzneidosen. Vortr. ärztl. Ver. München 15. Juli 1925. Ref. Münch. med. Wschr. **1925 II**, 1489. — Med. Klin. **21**, 1629 (1925).
96. Die Notwendigkeit der Eichung medizinischer Spritzen. (Umfrage.) Med. Klin. **21**, 700 (1925).
97. Über Genußgifte. Naturw. **14**, 1091—1099 (1926). (Referat auf der Naturforscherversammlung zu Düsseldorf.)
98. Über die Adstringierwirkung des Aluminium-Acetates. J. Pharmacol. (Am.) **29**, 83—93 (1926).
99. Zur Behandlung der Rachitis durch Arsenik. (Fragekastennotiz.) Münch. med. Wschr. **1927 II**, 706.
100. Rudolf Magnus, Nachruf. Münch. med. Wschr. **1927 II**, 1676.
101. Pharmakologische Wertbestimmung von Drogen in: Th. Paul: Die Untersuchung der Arzneimittel des D.A.B. VI, S. 211—220. Berlin: Springer 1927.
102. Über Rauschgifte. Vortr. wiss. Ärzte-Ges. Innsbruck 24. Febr. 1928. Klin. Wschr. **1928 II**, 1715.
103. Klinisches und Pharmakologisches zur Avertinnarkose. Bem. z. d. Mitt. v. Fr. Nestmann in Klin. Wschr. **7**, 1901. — Klin. Wschr. **1928 II**, 2346.
104. Bayerischer Haschisch. Münch. med. Wschr. **1928 I**, 49.
105. Gleichzeitige i.v. Injektion mehrerer Stoffe. (Fragekasten.) Münch. med. Wschr. **1928 I**, 508.
106. Rektalnarkose mit Avertin. (Resorption und Dosierung.) Münch. med. Wschr. **1928 I**, 593.
107. Rektalnarkose mit Avertin II. Ausscheidung und Nebenwirkungen. Münch. med. Wschr. **1928 II**, 1279—1281.
108. Über Phosgen als Gift. Dtsch. Korrespondenzbl. Gesundh.wes. Münch. med. Wschr. **1928 II**, 1108.
109. Geleitwort zu Knaffl-Lenz: Biologische Wertbestimmung. Aepp. **135**, 259 (1928).
110. Urannephritis und Uranverteilung. Verh. dtsch. pharmak. Ges., 8. Tagg. Hamburg. Aepp. **138**, 134 (1928).
111. Neuere Digitalisforschung. Pathologie und Therapie der Zirkulationsstörungen. VI. Fortbildungslehrgang in Bad Nauheim. 18.—20. Septbr., S. 33—41. Leipzig: Georg Thieme 1929.
112. Massenvergiftung durch verbrennende Röntgenfilme. Münch. med. Wschr. **1929 II**, 1049.
113. Mit K. Schübel: Über den Alkaloidgehalt von Mutterkornspezialitäten. Münch. med. Wschr. **1929 II**, 2039, 2040.
114. Mit H. Wieland u. Th. Dorfmüller: Untersuchungen über das weibliche Sexualhormon. Vorl. Mitt. Hoppe-Seylers Z. **186**, 97—103 (1929).
115. Bemerkung zu H. J. Fuchs: Zwei neue Laboratoriumsapparate. Biochem. Z. **206**, 505 (1929).
116. Phosphorwasserstoff-Vergiftung, tödliche? Slg. Vergift.fälle **1 A**, 51; 115 (1930).
117. Alkohol zur i.v. Anästhesie (Fragekasten). Münch. med. Wschr. **1930 I**, 88.
118. Postmortale Bildung von Blausäure aus Veronal u. a. (Fragekasten.) Münch. med. Wschr. **1930 I**, 348.

119. Pharmakologisches zur Therapie mit Phosphorlebertran. Münch. med. Wschr. **1930 I**, 577.
120. „Angliolymphe", ein Geheimmittel (Fragekasten). Münch. med. Wschr. **1930 II**, 2226.
121. Paul Trendelenburg, Nachruf. Dtsch. med. Wschr. **1931 I**, 374.
122. Die Effektivdosis der Digitalisstoffe. Z. ärztl. Fortbild. **28**, 1—3 (1931).
123. Lane lecture on pharmacology. Stanford Univ. Publ., Ser.: Med. Sci. **3**, Nr 1. Stanford Univ. **1931**, 87.
124. Mit H. Merkel u. J. Sedlmeyer: Tollkirschen-Vergiftung (tödliche?) (Giftmord?). Slg. Vergift.fälle **2** A, 141; 129 (1931).
125. Hormone, Vitamine und Volksgesundheit. Vortrag 31. Oktbr. 1930. Dtsch. Forsch. **1931**, H. 16, 40—50.
126. Ersatzmittel (Fragekasten). Münch. med. Wschr. **1931 II**, 1619, 1620.
127. Studien über Dünndarmperistaltik am Darm in situ (nach Versuchen von Dr. Pierre Viaud, Lyon). Verh. dtsch. pharmak. Ges., 11. Tagg. Wiesbaden **1932**. Aepp. **167**, 72, 73 (1932).
128. Mit P. Viaud: Studien über Darmmotilität. I. Methodik. Aepp. **169**, 1—8 (1932).
129. Mit H. Schild: Studien über Darmmotilität. II. Zur Physiologie und Pharmakologie des Dickdarmes. Aepp. **169**, 9—17 (1932).
130. Mit E. Leo: Studien zur Darmmotilität. III. Der Tonus und die Dehnungskurve des ruhenden Darmes. Aepp. **169**, 18—24 (1932).
131. Verwendung von Hypophysenpräparaten durch Hebammen (Fragekasten). Münch. med. Wschr. **1932 I**, 151.
132. Bau, Resorption und Bindung von Digitalisstoffen. Der Weg zur rationellen Therapie. S. 46—56. Vortr., gehalten zu Heidelberg vom 1.—3. Aug. 1932. Leipzig: Georg Thieme 1932.
133. Zur Frage der Ärztemuster. Münch. med. Wschr. **1933 I**, 20—22.
134. Unbekömmlichkeit von Veronalersatz (Fragekasten). Münch. med. Wschr. **1933 II**, 1873.
135. Mit E. Munoz Fernandes: Studien über Darmmotilität. V. Totalanalyse der Alkaloide der Atropingruppe. Aepp. **170**, 26—38 (1933).
136. Mit E. Leo: Resorption von Wasser und von Wasser aus Salzlösungen im Darm. Aepp. **170**, 534—545 (1933).
137. Mit M. Ozaki: Studien über Darmmotilität. VI. Totalanalyse der Alkaloide der Morphingruppe. Aepp. **173**, 374—380 (1933).
138. Opiatwirkung oder fahrlässige Kindestötung? Slg Vergift.fälle 4 A, 105 (1933).
139. Mit E. Triendl: Peristaltik und Wasserresorption im Katzendarm. Aepp. **175**, 518—527 (1934).
140. Mit E. Triendl: Über die Wirkung des Senna-Infuses auf den Dickdarm der Katze. Aepp. **175**, 528—535 (1934).
141. Verträglichkeit destillierten Wassers (Fragekasten). Münch. med. Wschr. **1934 I**, 221.
142. Das Mutterkorn im Wandel der Zeiten. Münch. med. Wschr. **1934 I**, 349—351.
143. Über Mischspritzen. Münch. med. Wschr. **1934 II**, 972.
144. Der Tod Alexanders VI. und das Borgia-Geheimnis. Eine toxikologische Studie. Schweiz. med. Wschr. **1935 I**, 389—392.
145. 150 Jahre Digitalis. Schweiz. med. Wschr. **1935 I**, 888—894.
146. Fehlerhafte Rezeptierung einer Cocain-Suprareninlösung (Fragekasten). Münch. med. Wschr. **1935 I**, 27.
147. Begrüßungsrede anläßlich der 12. Versig. der dtsch. pharmakol. Ges. in München **1935**. Aepp. **181**, 19 (1935).

148. Sennesblätter. Verh. 12. Pharmakol.-Kongr. München. Aepp. **181**, 171 (1936).
149. Vorsicht mit Atophan!. Münch. med. Wschr. **1936 I**, 169.
150. Desinfektionslösung zum Transport und zur Daueraufbewahrung von Spritzen (Fragekasten). Münch. med. Wschr. **1936 I**, 250.

151. Chloroform als Wurmmittel (Fragekasten). Münch. med. Wschr. **1936 I**, 324.
152. Convallaria und Convallan. Münch. med. Wschr. **1936 I**, 386, 387.
153. Verstopfung und Abführmittel. Med. Klin. **32**, 1029—1036 (1936).
154. Mit H. Gebhardt: Über die wirksamen Inhaltsstoffe der Folia Sennae. Aepp. **181**, 399—407 (1936).

155. Mit J. Scholz: Versuche über den Vagusstoff. Aepp. **182**, 331—339 (1936).
156. Mit F. v. Bergmann: Versuche zu einer Wertbestimmung der Folia Sennae. Aepp. **183**, 697—699 (1936).
157. Analyse der Darmwirkung der Folia Sennae. Festschr. für E. Chr. Barell, S. 151—157. Basel 1936.

158. Vergiftungserscheinungen durch Tintenstift (Fragekasten). Münch. med. Wschr. **1937 I**, 178.
159. Intravenöse Morphiuminjektion (Fragekasten). Münch. med. Wschr. **1937 I**, 387.
160. Das Problematische am Kampfer (Fragekasten). Münch. med. Wschr. **1937 I**, 432.
161. Ein Unfug (Spezialitäten ohne eindeutige Deklaration). Münch. med. Wschr. **1937 I**, 438.
162. Bedeutungslosigkeit der Vergällungsmittel für die Desinfektionskraft des Alkohols. (Fragekasten.) Münch. med. Wschr. **1937 I**, 624.

163. Was ist Zugluft, welche krankheitsauslösende Wirkungen kommen ihr zu und wie erklärt man ihr Zustandekommen? Rundfrage. Münch. med. Wschr. **1937 I**, 824.
164. Mit E. Triendl: Theorie der Abführwirkung der Folia Sennae und ihrer wirksamen Inhaltsstoffe. Aepp. **185**, 1—19 (1937).
165. Mit K. Stefansson: Wirkungsbedingungen des Acetylcholins am Darm. Aepp. **185**, 435—449 (1937).
166. Mit K. Stefansson: Über den Einfluß der Vagusreizung auf die Peristaltik des Meerschweinchendünndarms. Aepp. **185**, 450 (1937).

167. Zwei Präzisionsspritzen. Aepp. **185**, 456—459 (1937).
168. Vorrichtung zur Verhütung des Leertropfens des ausgeschnittenen Froschherzens nach Straub. Aepp. **185**, 460 (1937).
169. Wirkungsbedingungen des Acetylcholins am Darm. Arch. ital. Sci. farmacol. Suppl. **6**, 447—451 (1937).

170. Discussion on the chemical and physical Basis of pharmacological action 12. Nov. 1936. Proc. roy. Soc., Lond. Ser. B **121**, 580 (1937).
171. W. Straub zu Dales Ziel und Zukunft der Pharmakologie. 16. internat. Physiol-Kongr. 1938. Kongr.-Ber. III, S. 90, 91. (Zürich.)
172. Recherches comparatives sur l'activité de la morphine et de la dihydrodesoxymorphine. Bull. mensuel de l'Office internat. d'Hygiéne publique **30**, 2569—2581 (1938).
173. Kaffee und Coffein. Verh. dtsch. pharmakol. Ges., 14. Tagg. Berlin **1938**, 118.

174. Entbittertes Bitterwasser. Schweiz. med. Wschr. **1938 II**, 1341.
175. Mit Z. Kanda u. F. Zinnitz: Ein Umrechnungsfaktor von gefundenem Meerschweinchentiter auf gesuchten Froschtiter in der Auswertung von Digitalisdrogen. Aepp. **194**, 1—15 (1940).

176. Mit K. Stefansson: Über akute Ferro-Eisenwirkungen. Aepp. **194**, 269—276 (1940).
177. Mit A. Amann: Nikotin und die Diätetik des Tabakrauchens. Aepp. **194**, 429—439 (1940).

178. Mit E. Triendl: Über die Messung analgetisch-sedativer Wirkung am Tier und die Übertragbarkeit der Messungsresultate auf den Menschen. Aepp. **195**, 481—490 (1940).
179. Mit A. Amann: Über die Wirkung des Nikotins und des Tabakgenusses. Klin. Wschr. **1940 I**, 169.
180. Grundsätzliches zur Darreichungsform des Ovarialhormones. (Nach Versuchen von M. Reiser.) Klin. Wschr. **1940 I**, 911, 912.
181. Mit D. N. Kesarbani: Eine Methode der biologischen Auswertung von Coffein. Aepp. **197**, 457—468 (1941).
182. Mit R. Domenjoz: Weitere Untersuchungen über die Coffeinstarre am ausgeschnittenen Muskel des Frosches. Aepp. **198**, 79—86 (1941).
183. Über Zeit/Menge-Beziehungen bei der Digitalisauswertung nach Knaffl-Lenz am Meerschweinchen. Aepp. **198**, 189—194 (1941).
184. Herz, Kreislauf und Nikotin. Genußgifte **37**, H. 1, 18—21 (1941).
185. Mit E. Triendl u. J. Bode: Über Zeit/Menge-Beziehungen bei der Digitalisauswertung am Meerschweinchen. II. Mitt. Versuche mit Reinsubstanzen. Aepp. **199**, 427—434 (1942).
186. Mit F. Dordoni: Biologische Auswertung von Theobromin und Kakao. (Herrn Prof. Heubner zum 65. Geburtstage gewidmet.) Aepp. **200**, 129—134 (1942/43).
187. Kaffeenöte einst und jetzt. Schweiz. med. Wschr. **1943 I**, 221.
188. Phosphorvergiftung und Phosphorbrandwunden. Münch. med. Wschr. **1943**, 507.
189. Phosphorvergiftung und Phosphorbrandwunden. Münch. med. Wschr. **1943**, 629.
190. Phosphorbrandwundenbehandlung. Münch. med. Wschr. **1943**, 748.
191. Pharmakologisches über Kupfersulfat. Münch. med. Wschr. **1944**, 8.

Emil Starkenstein †.

Erst seit kurzer Zeit wurde die schon lange gehegte Befürchtung, daß Emil Starkenstein nicht mehr unter den Lebenden weilt, zur Gewißheit.

Das Wiedererscheinen von Naunyn-Schmiedebergs Archiv gibt Gelegenheit, seines Werdeganges und Wirkens zu gedenken.

Er wurde im Dezember 1884 in Ronsperg in Böhmen als Sohn eines Landarztes geboren. Nach Absolvierung der Mittelschule in Pilsen studierte er Medizin an der Deutschen Universität in Prag. Nach dem Doktorat trat er in das Pharmakologisch-Pharmakognostische Institut ein, woselbst er zunächst als wissenschaftlicher Assistent, später als Dozent und seit 1920 als a.o. Professor für experimentelle Pharmakologie und Pharmakognosie wirkte. 1929, ein Jahr nach dem Tode Wilhelm Wiechowskis, wurde er mit dem verwaisten Lehrstuhl betraut und verwaltete ihn, bis die politischen Verirrungen des Jahres 1938/39 und der Rassenhaß zu seiner Amtsenthebung führten. Er wandte sich darauf Anfang 1939 nach Holland, wo er im Rahmen der Amsterdamschen Chininfabrik eine bescheidene Betätigungsmöglichkeit fand. Nach der deutschen Besetzung von Holland wurde er Ende Oktober 1941 interniert. Nach einjährigem Aufenthalt in Gefängnissen und Konzentrationslagern zu Amsterdam, Scheveningen, Cleve, Prag und Theresienstadt starb er in Mauthausen am 6. November 1942.

Emil Starkenstein in jüngeren Jahren.

Gemäß der Tradition des von Hofmeister begründeten Prager Pharmakologisch-Pharmakognostischen Instituts behandeln die ersten Arbeiten Starkensteins unter seinen Lehrern Pohl und Wiechowski Fragen des Stoffwechsels. Die Beschäftigung mit dem Purin-Haushalt veranlaßte die Untersuchung des Atophans, die ihn zur Erkenntnis der entzündungshemmenden Wirkung dieses Stoffes führte und Vergleiche mit ähnlichen Wirkungen des Kalziums anregte. Fragen der Entzündungsbeeinflussung haben, von dieser Grundbeobachtung ausgehend, in späteren Arbeiten und Gedankengängen Starkensteins stets eine große Rolle gespielt und

veranlaßten ihn auch zur Beschäftigung mit der unspezifischen Therapie. In den Rahmen der Stoffwechselstudien gehören Untersuchungen über den Mineralstoffwechsel, insbesondere über die Rolle der Kohlensäure in Mineralwässern und die diuretische Wirkung verschiedener Wässer. Das Interesse am Mineralstoffwechsel konzentrierte sich während seiner Tätigkeit als Institutsleiter auf den Eisenstoffwechsel und die damit zusammenhängende Pharmakologie des roten Blutbildes. Eigene Arbeiten und solche seiner Mitarbeiter unterstrichen die grundlegende Beobachtung Heubners, daß Eisen nur in der Fe^{II}-Stufe zur Resorption gelangt und führten zu einer konsequenten Klassifikation und Bewertung der arzneilich verwendeten Eisenpräparate. Unveröffentlichte, umfangreiche Arbeiten beschäftigen sich mit der Frage der Isolierung von Wirkstoffen aus dem Knochenmark, die auf die Blutbildung Einfluß zu nehmen in der Lage wären. Zahlreiche Untersuchungen und Überlegungen widmete Starkenstein auch den Problemen der Arzneikombination. Zusätzlich zu der von Bürgi vertretenen Regel wurde von ihm eine weitere zwecks Auswahl der Kombinationspartner aufgestellt, die darin begründet ist, daß Stoffe gleichgerichteter Hauptwirkung mit solchen entgegengesetzt gerichteter Nebenwirkung kombiniert werden sollen, um den gewünschten Effekt zu verstärken und unerwünschte Nebenerscheinungen einzudämmen.

Aus den Forschungen Starkensteins sind in Zusammenarbeit mit der Industrie drei Präparate hervorgegangen: *Veramon, Vasano, Ferrostabil.* Die beiden ersteren, fußend auf seinen Studien über Arzneikombination, haben zahlreiche Nachahmungen und Neuschöpfungen auf diesem Gebiete angeregt. Das gleiche gilt auch für das Ferrostabil, das die praktische Konsequenz seiner Studien über den Eisenstoffwechsel darstellt. Nicht zuletzt durch diese Präparate sind die Arbeiten Starkensteins weiten Kreisen bekannt geworden und haben dadurch eine ungemein fruchtbare Kritik und Diskussion ausgelöst.

Fast ebenso bedeutungsvoll wie Starkensteins Wirken als Forscher ist seine umfangreiche Tätigkeit als wissenschaftlicher Schriftsteller und Lehrer. Von Natur aus mit ausgesprochenem Lehrtalent begabt, war er in der Lage, nicht nur seiner engeren Hörerschaft anschaulich Kenntnisse zu vermitteln, sondern es drängte ihn auch, vor einem breiteren Forum über sein Fachgebiet zu berichten. Von dieser Tätigkeit zeugen seine Abhandlungen in bekannten Handbüchern, die sich vorwiegend mit den von ihm experimentell bearbeiteten Themen befassen, sowie eine große Zahl von Vorträgen und Referaten, die teils auf wissenschaftlichen Tagungen, teils vor einem gebildeten Laienpublikum verschiedenartiger Zusammensetzung gehalten wurden, ferner seine Beiträge in der von ihm längere Zeit redigierten, der Fortbildung der deutschen Ärzte in der tschechoslowakischen Republik gewidmeten Zeitschrift „Beiträge zur ärztlichen Fortbildung", die sich mit verschiedenen Fragen der experimentellen

Pharmakologie, praktischen Arzneitherapie und Arzneiherstellung beschäftigen. Im Rahmen dieser Tätigkeit ist auch die Mitarbeit am Lehrbuch der Toxikologie gemeinsam mit Pohl und Rost zu nennen, in dem Starkenstein die anorganischen Gifte behandelt, und ganz besonders die Abfassung des „Lehrbuches der Pharmakologie, Toxikologie und Arzneiverordnung" (Verlag Deuticke, 1938). Letzteres hat als Folge der politischen Umwälzungen nicht die verdiente Verbreitung gefunden. Daß es einem Bedürfnis der Hörer und Ärzte vollinhaltlich entsprach, zeigt die große Nachfrage nach diesem Buch auch noch zu einer Zeit, als sein Weitervertrieb durch die politischen Strömungen erschwert und schließlich eine Neuauflage unmöglich geworden war.

Dem Wunsche nach allseitig gedanklicher Durchdringung seines Faches entsprangen seine historischen Studien auf dem Gebiet der Arzneimittellehre, die in einer medico-historischen Spezialvorlesung ihren Niederschlag fanden und ihn veranlaßten, eine umfangreiche, wohl einzigartige Sammlung von Kräuterbüchern anzulegen. Seiner gewandten Feder verdanken wir eine Anzahl von Abhandlungen über den Inhalt dieser Sammlung.

Alle Veröffentlichungen Starkensteins trugen als gemeinsames Merkmal eine große Klarheit in der Anordnung der Gedankengänge, verbunden mit einem überzeugenden, den Leser fesselnden Stil. Diese Eigenschaft zeichnete nicht nur seine Vorträge, sondern auch insbesondere seine Vorlesungen aus, in denen er durch klare, leicht faßliche Schematisierung auch schwer verständliche biologische Abläufe der Zuhörerschaft nahebrachte. Freilich konnte er auch zugunsten einer Arbeitshypothese gelegentlich die Schematisierung sehr weit treiben, z. B. in der Verwendung des Begriffes der Enthemmung. Um die Verbesserung der Darstellungsweise in didaktischer Beziehung blieb er dauernd bemüht. Der außergewöhnliche Zustrom zu seinen Vorlesungen bestätigte die Richtigkeit seiner Methode.

Emil Starkenstein war von Natur aus ein glücklich veranlagter Mensch, der in starker Lebensbejahung allen Freuden und Genüssen aufgeschlossenen Herzens gegenüberstand. Sein Leben verlief zum großen Teil unter günstigen äußeren Verhältnissen und gestattete ihm, seinen vielseitigen Neigungen nachzugehen. Reisen in das europäische Ausland, außerdem mehrere Seereisen, die ihn schon als jungen Arzt in der Funktion eines Schiffsarztes in das Mittelmeer und später nach Nord- und Südamerika führten, vermittelten nicht nur zahlreiche wissenschaftliche Verbindungen, sondern gaben auch Gelegenheit zum Studium der Seekrankheit. Es ist erstaunlich, daß die umfangreiche Tätigkeit als Lehrer und Forscher Starkenstein auch noch Zeit ließ, in reichem Ausmaß schöngeistigen Interessen sich hinzugeben. In den Werken unserer Klassiker wußte er gut Bescheid und war insbesondere ein großer Goethe-Verehrer. Aber auch die zeitgenössische Literatur fesselte ihn. Gute Konzerte und Theatervorstellungen pflegte er regelmäßig zu besuchen; auch den bildenden

Künsten brachte er großes Interesse entgegen und ließ in den letzten Jahren Prager Künstlern wirksame Förderung angedeihen.

Die vielseitige Aktivität Starkensteins wäre wohl kaum denkbar gewesen, wenn ihm nicht ein glückliches, durch zwei begabte Kinder gesegnetes Familienleben und ein schön gepflegtes Heim einen Ausgleich geboten hätten.

Es war eine Forscherlaufbahn, die lange Jahre durch Glück und Erfolg außerordentlich begünstigt, zuletzt durch die Ungunst der äußeren Verhältnisse gehemmt war, durch menschlichen Irrwahn in tragisches Leiden ausmündete und unverdient ein vorzeitiges Ende fand.

Berlin, im Juni 1946. K. Junkmann, Berlin.

Verzeichnis wissenschaftlicher Schriften von Emil Starkenstein †[1].

Skutetzki u. Starkenstein: Die neueren Arzneimittel in der ärztlichen Praxis, 2. Aufl. Berlin: Springer etwa 1914.
Starkenstein, E., E. Rost u. J. Pohl: Lehrbuch der Toxikologie. Berlin u. Wien: Urban & Schwarzenberg 1929.
Starkenstein: Pharmakologie des Eisens. In Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. 3/II. Berlin: Springer 1934.
Starkenstein: Lehrbuch der Pharmakologie, Toxikologie und Arzneiverordnung (unter Mitarbeit von Hedwig Langecker, Franz Hendrych, Karl Klimesch und Hans Weden). Leipzig u. Wien: Franz Deuticke 1938.

Über die Beeinflussung des Purinstoffwechsels durch Phenylcinchoninsäure (Atophan). Naunyn-Schmiedebergs Arch. **65**, 177 (1911).
Eigenschaften und Wirkungsweise des diastatischen Fermentes der Warmblüter. Biochem. Z. **24**, 191.
Über Fermentwirkung und deren Beeinflussung durch Neutralsalze. Biochem. Z. **24**, 210.
Das Verhalten der Uransalze zweibasischer Phosphorsäuren gegen Indikatoren. Biochem. Z. **32**, 235 (1911).
Ionenwirkung durch Phosphorsäuren. Biochem. Z. **32**, 243 (1911).
Über die Unabhängigkeit der Diastasewirkung von Lipoiden. Biochem. Z. **33**, 423 (1911).
Über die Fermentwirkung und deren Beeinflussung durch Neutralsalze II. Biochem. Z. **47**, 300 (1912).
Über die pharmakologische Wirkung kalziumfällender Säuren und der Magnesiumsalze. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **77**, 45 (1914).
Über die therapeutische Anwendung der Tierkohle. Münch. med. Wschr. **1915**, Nr 1 (Feldärztl. Beilage Nr 1).
Demonstration zur Wirkung der Tierkohle auf Bakterien. Straßbg. med. Ztg **1915**, H. 12.
Fieber und Fiebermittel. Ther. Mh. **1917**, H. 2.

[1] Wegen der zur Zeit bestehenden Schwierigkeiten im Bibliothekswesen konnte Vollständigkeit nicht erreicht werden. Auch mußten die zahlreichen Arbeiten von Starkensteins Schülern außer Betracht bleiben. Ferner war ein Verzicht auf die medizinhistorischen und schöngeistigen Veröffentlichungen Starkensteins nicht zu vermeiden.

Fleckfieberstudien. Wien. klin. Wschr. **1917**, Nr 5.
Symptomatische Therapie auf experimentell-pharmakologischer Grundlage. Ther. Mh. **1917**, H. 5.
Untersuchungen bei Fleckfieberkranken. Med. Klin. **1917**, 779.

Mit Zitterbart: Experimentelle und klinische Untersuchungen über das Verhalten gleichzeitig anwesender Antigene und Antikörper. Wien. klin. Wschr. **1918**, Nr 50.
Klinische Pharmakologie, Theorie und Praxis am Krankenbett. Ther. Gegenw. **1918**.
Proteinkörpertherapie und Entzündungshemmung (Experimentelle und klinische Untersuchungen). Münch. med. Wschr. **1919**, Nr 8 u. 9.
Beiträge zur Physiologie und Pharmakologie des Purinhaushalts. Die Beeinflussung des Purinhaushaltes durch Atophan, Calciumsalze und Radiumemanation. Biochem. Z. **106**, 139 (1920).
Über die Wirkung des Atophans. Biochem. Z. **106**, 172 (1920).
Die physiologischen und pharmakologischen Grundlagen der Calciumtherapie Ther. Halbmh. **35**, 553, 585 (1921).
Die pharmakologische Bewertung der Chinin-Digitaliskombination bei Herzkrankheiten. Dtsch. med. Wschr. **1922 I**, 414, 448.
Über die pharmakologische Beeinflussung der Nierenfunktion. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **92**, 339 (1922).
Die Wirkung der Phenylchinolincarbonsäure (Atophan) auf die Leukocyten. Dtsch. med. Wschr. **1922 II**, 1161.
Zur Wirkungsweise der Phenylchinolincarbonsäure. Dtsch. med. Wschr. **1922 II**, 1677.
Über die pharmakologische Beeinflussung der Nierenfunktion. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **92**, II, 339 (1922).
Neue pharmakologische Richtlinien für die Eisentherapie. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **96**, XL (1922).
Der Einfluß experimentell-pharmakologischer Forschung auf die Erkennung und Verhütung pharmakotherapeutischer Irrtümer. — Irrtümer der allgemeinen Diagnostik und Therapie sowie deren Verhütung. In Handbuch der inneren Medizin. Leipzig 1923.
Zur Frage der Wirkung der Phenylchinolincarbonsäure (Atophan) auf das vegetative Nervensystem. Z. exper. Med. **43**, 449 (1924).
Über die Abhängigkeit der Diurese vom Salzgehalt und der Wasserstoffionenkonzentration des getrunkenen Wassers. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **104**, 6 (1924).
Beiträge zur Pharmakologie des Eisens. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **118**, 131 (1926).
Konstitution und Wirkung anorganischer Verbindungen. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **119**, 44 (1926).
Gibt es erregende Wirkungen des Morphins? Prag. Arch. Tiermed. **6**, Teil A, H. 1, 61 (1926).
Durst und Durststillung. XII. internat. Physiologenkongr., Stockholm 3.—6. Aug. 1926, S. 155.
Synergismus und Antagonismus im Veramon. Bemerkungen zu den Ausführungen Bürgis in Dtsch. med. Wschr. **39**, 1645; **1926 II**, 2189.
Wasserhaushalt und Durststillung. Klin. Wschr. **1927 I**, 147.
Pharmakotherapie der Seekrankheit. Med. Klin. **23**, 1489, 1529 (1927).
Therapeutischer Wert und chemische Wertigkeit der Eisenpräparate. Ther. Gegenw. **69**, 394, 451 (1928).
Über die Resorbierbarkeit von Eisenverbindungen aus dem Verdauungskanal. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **127**, 101 (1928).
Demonstration der Resorption von Eisensalzen vom Magen-Darmkanal. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **128**, 137 (1928), Verh.ber.

Mit H. Weden: Über das anorganische Eisen des Organismus. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **134**, 274 (1928).

Mit H. Weden: Über das Schicksal des anorganischen Eisens in überlebenden Organen. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **134**, 288 (1928).

Mit H. Weden: Über das Schicksal des anorganischen Eisens im Organismus nach Zufuhr einfacher Ferro- und Ferriverbindungen. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **134**, 300 (1928).

Die intermediären und terminalen Produkte des Eisenstoffwechsels (13. internat. Physiologenkongr. Boston 1929). Amer. J. Physiol. **90**, 527 (1929).

Über den intermediären Eisenstoffwechsel. Z. exper. Med. **68**, 425 (1929).

Der Kreislauf des Eisens im Organismus. Naturw. **1930 II**, 875.

Angebliche Glaspulververgiftung. Slg Vergift.fälle **1** (1930).

Mit H. Weden: Über das Schicksal des Eisens im Organismus nach Zufuhr von komplexen Verbindungen mit anorganisch und organisch gebundenem Eisen. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **150**, 354 (1930).

Probleme der Entzündung vom pharmakologischen Standpunkt aus. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **157**, 22 (1930).

Mit H. Langecker: Über die pharmakologische Wirkung einiger neuer Papaverinderivate. Klin. Wschr. **1931 II**, 2257.

Die Bedeutung der Begriffe anorganisch, organisch und organisiert für die Arzneimittellehre. Med. Klin. **1932 I**, 466.

Zur experimentellen Analyse chronischer Vergiftungen. Klin. Wschr. **1932 II**, 1697.

Über die Substituierbarkeit physiologisch lebenswichtiger Mineralstoffe durch andere Stoffe der gleichen chemischen Gruppe. Med. Klin. **1932 II**, 1375.

Über die Abhängigkeit der Funktion des Knochenmarks von der Jahreszeit. Verh. 14. internat. Physiologenkongr. **1932**, 240.

Zur Methodik der Prüfung schmerzstillender Mittel im Tierversuch. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **165**, 325 (1932).

Zur experimentellen Analyse chronischer pharmakologischer Wirkungen. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **167**, 67 (1932).

Über die diuretische Wirkung oral zugeführter Zuckerlösungen verschiedener Konzentrationen. Schweiz. med. Wschr. **1932 I**, 399.

Periodische Schwankungen der Knochenmarksfunktion und der Blutbildungen und ihre Abhängigkeit von der Jahreszeit. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **172**, 36 (1933).

Mit G. Hahnel: Über die Bedingungen der Bildung lipoidlöslicher Salze in gelösten Chloridsulfatgemengen. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **172**, 55 (1933).

Mit Z. Harvalik: Über eine im intermediären Eisenstoffwechsel entstehende Ferriglobulinverbindung. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **172**, 75 (1933).

Mit Fr. Johna: Über Oxydation und Reduktion des Eisens in den Organen. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **172**, 93 (1933).

Mit R. Neiger: Die Autoxydation der Ferrisalze und die Haltbarkeit ihrer Lösungen. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **172**, 104 (1933).

Mit W. Stejskal: Über den katalytischen Einfluß von Eisensalzen auf die Zersetzung des Nikotins beim Rauchen. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **172**, 119 (1933).

Mit Th. Wasserstrom: Pharmakologische und chemische Untersuchungen über die wirksamen Bestandteile des Urtica dioica und Urtica ureus. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **172**, 137 (1933).

Mit F. Hendrych, J. Escobar-Bordoy: Zur experimentellen Analyse der Pyramidonwirkung. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **176**, 486 (1934).

Mit H. Langecker: Tödliche Adrenalinvergiftung als Folge fehlerhafter Arzneiverordnung. Slg. Vergift.fälle A, **5**, 107.

Mit H. Langecker: Akute Thalliumvergiftung als Folge fehlerhafter Arzneiverordnung und Arzneiabgabe. Slg Vergift.fälle A, **5**, 117.

Tonica und Roborantia. Empirisch eingeführte Arzneimittel und ihre experimentell-pharmakologische Analyse. Schweiz. med. Wschr. **1934 II**, 1124.
Bedingungen für das Zustandekommen maximaler diuretischer Effekte. Rev. Pharmacol. (Fr.) **3**, 1 (1934).
Das Problem der humolaren, solidären und cellulären Wirkung und seine Beziehung zur Mineralstofftherapie. Med. Klin. **1935 II**, 1260.
Zur Physiologie und Pharmakologie der Sterine. I. Die allgemeine Bedeutung des Cholesterins im Sterinhaushalte. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **182**, 654 (1936).
Mit Fr. Hendrych: Zur Physiologie und Pharmakologie der Sterine. II. Die Bedeutung des Cholesterins für Permeabilität und Resorption. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **182**, 664 (1936).
Mit H. Weden: Zur Physiologie und Pharmakologie der Sterine. IV. Der Einfluß des Cholesterins auf die Wirkung der Hypnotica und Narcotica. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **182**, 700 (1936).
Mit H. Weden: Zur Physiologie und Pharmakologie der Sterine. V. Über den Einfluß der Cholesterinmobilisierung durch Saponine auf die Wirkung von Schlafmitteln. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **182**, 715 (1936).
Mit H. Weden: Beitrag zur pharmakologischen Wirkung des Bienengiftes. Med. Klin. **1936 II**, 927.
Mit E. Winternitz: Die Coffeinwirkung des schwarzen und des Milchkaffees. Schweiz. med. Wschr. **1937 I**, 454.
Organ und Organismus unter pharmakologischem Einfluß. Verh. Kongr. synth. Leberforsch. **1937**, 118.
Die Bedeutung der biochemischen Artmerkmale für entwicklungsgeschichtliche Fragen. Fiziol. Z. **22**, 593 (1937).
Mit Fr. Zettl: Die Bedingungen der Zerstörbarkeit des Morphins im Opium und im Opiumextrakt. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **187**, 259 (1937).
Die Entwicklung der endogenen Harnsäureausscheidung als Grundlage für die Bemessung der Arzneimitteldosen im Kindesalter. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **187**, 684 (1937).
Mit H. Weden: Sind Ionen oder Komplexe die pharmakologisch wirksame Zustandsform der Metalle? Naunyn-Schmiedebergs Arch. **187**, 689 (1937).
Ein Beitrag zur Erklärung der „erregenden" Wirkungen des Chinins als Folge einer Enthemmung. Arch. internat. Pharmacodynam. **62**, 146 (1939).
Nervöse Hemmungen als Angriffspunkte pharmakologisch wirkender Stoffe. Acta brev. Neerl. Physiol. **9**, 103 (1939).
Der Purinstoffwechsel als biochemisches Artmerkmal. Harnsäure-Allantoinbestimmungen im Gibbonharn. Acta brev. Neerl. Physiol. **11**, 152 (1941).
Über ein „Sauerstoffphänomen". Beitrag zur Analyse der Adrenalinwirkung und der Motorik überlebender glattmuskulärer Organe. Arch. internat. Pharmacodynam. **65**, 423 (1941).
Pharmakologische Analyse der Chinaalkaloide. 1. Mitt. Das Chinaproblem. Arch. internat. Pharmacodynam. **66**, 61 (1941).
2. Mitt. Die Wirkung der Chinaalkaloide auf das Hirudo-Präparat. Arch. internat. Pharmacodynam. **66**, 168 (1941).
Mit Zagt: 3. Mitt. Die Wirkung der Chinaalkaloide auf den Darm. Arch. internat. Pharmacodynam. **67**, 74 (1942).
Mit Zagt: 4. Mitt. Die Wirkung der Chinaalkaloide auf das Oesophagus-Magenpräparat des Frosches. Arch. internat. Pharmacodynam. **67**, 136 (1942).
Die Differenzierung der durch die Phenantrenderivate des Opiums und durch Apomorphin auslösbaren Krämpfe hinsichtlich ihrer Abhängigkeit von zentralen Hemmungen. Arch. internat. Pharmacodynam. **65**, 329 (1943).

Ein halb Jahrhundert Pharmakologie.

Von

Wolfgang Heubner.

(Eingegangen am 8. Mai 1944.)

Der folgende Aufsatz wurde geschrieben, um Walther Straub zu seinem 70. Geburtstag eine Freude zu machen. Ich ließ das Manuskript am 8. Mai 1944 dem Jubilar durch einen persönlichen Boten, Fritz von Bergmann, überreichen und Straub selbst hat es dann zum Druck gegeben. Nachdem er — mit einem ganzen Heft weiterer Arbeiten — noch während des Krieges zweimal gedruckt und umbrochen und zweimal durch Feuer vernichtet war, möge er nun als ein Zeichen pietätvoller Erinnerung an den langjährigen Schriftleiter dieses Archives von seinen Lesern verstanden werden.

I.

Es kann nicht viel weniger als 50 Jahre her sein, seit der nunmehr 70jährige Walther Straub zum ersten Male in Berührung mit der Wissenschaft kam, der er seine Lebensarbeit widmen sollte. Wenn ich selbst nachzähle, so sind 44 Jahre vergangen seit ich zuerst eine Vorlesung über Pharmakologie (bei Liebreich) hörte. Es ist nicht ohne Reiz zu prüfen, wie sich in dieser Spanne Zeit der geistige Bereich gewandelt hat, den wir mit diesem Namen umfassen.

Freilich könnte man hier schon gewisse Schwierigkeiten sehen, nämlich in der Abgrenzung des „Bereichs", dem die Etikette „Pharmakologie" zukommt. Es war nicht lange vor Ausbruch dieses Krieges, daß gelegentlich des internationalen Physiologenkongresses in Zürich 1938 auf einer Zusammenkunft der Pharmakologen aller Länder die Frage in Referaten und Diskussion ausführlich behandelt wurde, was der eigentliche charakteristische Inhalt dieser Wissenschaft und wo ihre Grenzen zu stecken seien gegenüber den Nachbarwissenschaften. In der Tat ist die Zahl der wissenschaftlichen „Nachbarn" der Pharmakologie ungewöhnlich groß und wie es so unter Nachbarn zu gehn pflegt, fehlt es nicht an Streit über die „Grenzen". Gelegentlich gibt es auch Vertreter der Nachbarschaft, die einen Gebietsanspruch damit begründen, daß sie es besser verstünden, das Gebiet nutzbar zu machen, als die Vertreter der Pharmakologie selbst — eine Begründung mit etwas politischem Beigeschmack.

In Wahrheit ist die Situation dadurch bedingt, daß der Gegenstand der Pharmakologie so mannigfaltige Seiten hat. Leiten sich doch schon von dem Wort „Pharmakon" *zwei* Wissenschaften ab, die seit Jahrhunderten getrennt nebeneinander bestehen und auch schon lange verschiedenen Fakultäten angehören, die Pharmazie und die Pharmakologie.

Der Unterschied zwischen beiden ist freilich vielen Fernerstehenden nicht klar. Sachverständige wissen, daß er in der *Richtung* der Betrachtung liegt, der die gleichen Objekte unterzogen werden. Dieses Moment nun — so möchte ich meinen — ist es auch, das dem Begriff „Pharmakologie" seinen eigenen Charakter gibt, auch wenn sich naturgemäß Chemiker, Biochemiker, Physiologen, Pathologen, Mikrobiologen, Hygieniker, Gerichtsmediziner, Kliniker der verschiedenen Disziplinen, schließlich alle Ärzte, aber auch in gewissem Umfang Psychologen, Soziologen, Techniker, Garten- und Weinbauer wie auch andere Wirtschaftler für pharmakologische und toxikologische Wirkungen interessieren. Es ist aus diesem vielfältigen Interesse an dem gleichen Erscheinungsbereich ohne weiteres verständlich, daß zum Wissensbestande der Pharmakologie unzählige Beiträge von Beobachtern und Forschern geliefert worden sind, die nicht den Titel Pharmakologe tragen. Ja, in neuerer Zeit scheint dies noch zuzunehmen, seit die Isolierung immer weiterer „Wirkstoffe" aus tierischen Geweben, aus Nahrungsmitteln und aus Mikroorganismen durch die hochentwickelte chemische Kunst gelingt.

An sich ist die Entdeckung und nähere Erforschung pharmakologischer Wirkungen auf vielen „fremden" Fachgebieten nichts Neues. Gehen doch die Anfänge unserer Kenntnisse auf dem Gebiete der Pharmakologie (die die Toxikologie einschließt) ganz sicher auf primitive Erfahrungen zurück, die weit vor jeder Abgrenzung selbst von „Medizinmännern" liegen. Ernest Starling bezeichnete daher in seinem berühmten Referat über „Hormone" 1906 die Pharmakologie als „die älteste unter den Forschungen, die in Verbindung mit der Heilkunde erscheinen[1]".

Um die Jahrhundertwende beklagte es Schmiedeberg[2], der so sehr bemüht war, der Pharmakologie den Rang einer selbständigen rationellen und experimentellen Wissenschaft zu erobern und zu bewahren, daß „angehende Physiologen, Hygieniker, jüngere Kliniker und praktische Ärzte mit Vorliebe die Themata zu ihren experimentellen Erstlingsarbeiten dem pharmakologischen Gebiete entnehmen", und übte herbe Kritik an einer Reihe solcher Arbeiten. „Die Beschäftigung mit pharmakologischen Untersuchungen erfordert nicht nur eine große Übung in der Ausführung der Versuche und in der Beurteilung der Resultate, sondern es gehört dazu auch eine vollständige Kenntnis und sichere Beherrschung des ganzen pharmakologischen Gebietes." Seit dies geschrieben wurde, hat die methodische Technik große Fortschritte gemacht und die methodischen Anforderungen sind in allen experimentellen Laboratorien erheblich gewachsen, aber auch heute noch ist unverkennbar, daß eine „vollständige Kenntnis und sichere Beherrschung des ganzen pharmakologischen

[1] Starling, Ernest: Verh. Ges. dtsch. Naturf. **78, 1906 I,** 246, 259. —
[2] Schmiedeberg, Oswald: Vorwort zum Grundriß der Pharmakologie, 4. Aufl. 1902. 5. Aufl. 1906.

Gebietes" für die *Beurteilung der Resultate* ihre große Bedeutung besitzt. Auch ist es mehr als eine oberflächliche Analogisierung, wenn SCHMIEDEBERG fortfährt, „daß niemand in wissenschaftlicher Weise eine Pflanze zu beschreiben imstande ist, wenn er nicht umfassende botanische Kenntnisse besitzt". Denn eben die Vielfalt der Erscheinungen ist es, die die Anwendung des Vergleiches und des Systematisierens erzwingt, wenn eine geistige Beherrschung des Stoffes erreicht werden soll. Wie also neben dem Landwirt, dem Forstmann, dem Gärtner und Winzer, die alle auch ihre Wissenschaft haben, der Botaniker unentbehrlich ist im Gefüge der Wissenschaften, so ist es auch der Pharmakologe und man würde bald genötigt sein, diesen „Fachmann" erstehen zu lassen, sofern ihn die Entwicklung mit ihrer zwangsläufigen Tendenz zur zunehmenden Arbeitsteilung nicht längst erzeugt hätte. Des Gesichtspunkts der „Arbeitsteilung" war sich ebenfalls SCHMIEDEBERG tief bewußt: Er grenzte Physiologie, Pharmakologie und pathologische Physiologie als eine besondere, „exakte" Gruppe der biologischen Wissenschaften ab. „Es handelt sich bei dieser Einteilung, wie bei der verwandter Wissenschaften überhaupt, im Grunde nur um eine Arbeitsteilung. Für das Endresultat ist es gleichgültig, ob schließlich die Pathologie (lies „pathologische Physiologie!" HEUBNER) in die Pharmakologie aufgeht oder umgekehrt und ob beide dann mit der Physiologie zu einer einheitlichen Lebenslehre zusammenfließen[2]." Ich entsinne mich auch eines Gespräches mit FRANZ HOFMEISTER, der ja im Laufe seines Lebens nacheinander Professuren für Pharmakologie und für physiologische Chemie innehatte, in dem er nachdrücklich die unvermeidliche, besonders auch methodische Arbeitsteilung als die wesentliche Ursache für die Abtrennung so nahe verwandter Fächer kennzeichnete.

Es liegt also in der Natur der *Sache*, daß die Pharmakologie in ihrer Problemstellung und in ihrer Methodik weite Überschneidungen mit allen anderen Zweigen der Biologie aufweist. Was aber immer wieder gebieterisch ihre Abgrenzung fordert, sei es zunächst nur im Interesse einer gesonderten Sammlung und Ordnung ihres Wissensbestandes, das ist die praktische Bedeutung der von ihr umschlossenen wissenschaftlichen Tatsachen und Erkenntnisse für die Arzneitherapie und die Toxikologie, was im Grunde nichts anderes ist, als die immerwährende Erinnerung an ihren Ursprung. Was STARLING an der oben angeführten Stelle meinte, ist ja nichts anderes als was jede historische Forschung nach den Anfängen der Wissenschaften gelehrt hat und was z. B. in den Schriften von ERNST MACH[3] eindringlich behandelt ist, daß nämlich die Wissenschaft nur eine Fortsetzung des allgemeinen biologischen Verhaltens des Menschen darstellt, also seines Strebens, sich im Kampfe der Lebewesen zu behaupten und seinen Trieben und Wünschen Befriedigung zu verschaffen. Dazu gehörte von jeher die

[3] MACH, ERNST: Erkenntnis und Irrtum, 1905.

Abwehr und Bekämpfung gesundheitlicher Schäden, wie auch die Bewirkung solcher Schäden bei den Konkurrenten um die Freuden dieses Erdballes. In der antiparasitären „Chemotherapie" finden sich ja diese beiden Tendenzen zusammen.

Die praktischen Aufgaben haben es mit sich gebracht, daß in einem Zeitalter vielseitigster Beteiligung an Untersuchungen pharmakologischen Charakters sich dennoch das Bedürfnis nach einer *Vermehrung* der zünftigen Fachleute bemerkbar machte und durchsetzte. Die stets wachsende Produktion neuer, zu Heilzwecken brauchbarer chemischer Substanzen erzwang die Errichtung pharmakologischer Laboratorien in den großen pharmazeutischen Fabriken der ganzen Welt.

II.

Davon waren freilich vor 50 Jahren noch kaum die ersten Anfänge erkennbar. Synthetische Mittel spielten damals noch eine recht begrenzte Rolle in der Therapie. Wohl kannte man Salicylsäure, Antipyrin, Azetanilid, Phenazetin, sowie einige Schlafmittel wie Chloralhydrat, Paraldehyd, Sulfonal und damit war ja allerdings das Tor geöffnet, um zwei sehr verbreiteten therapeutischen Indikationen Genüge zu tun. Doch wußte man um die Mitte der 90er Jahre noch nichts vom Aspirin oder Pyramidon, die ihren älteren Vorläufern bald den Rang ablaufen sollten. Von stickstoffhaltigen Schlafmitteln war nur das Urethan bekannt, das man als ersten Anlauf zu den narkotischen Harnstoffderivaten betrachten kann; so tauchten auch die Barbitursäuren erst später auf, nachdem Emil Fischer 1903 das Diäthylderivat Veronal hergestellt hatte, das bis zum heutigen Tag den Markt beherrscht, obwohl es längst nicht mehr das Optimum therapeutischer Wirkung repräsentiert, das wir kennen. Die Lokalanästhesie war in ihren ersten Anfängen, weil sie sich auf das ziemlich gefährliche Cocain beschränken mußte. Von Antisepticis kannte man Sublimat, Phenol, Cresol (als Lysol) und ihre Derivate Dermatol und Xeroform, als „Specifica" — die etwa dem heutigen Begriff der Chemotherapeutica entsprachen — Quecksilber, Jodkalium und Chinin. Die Begriffe der Hormone oder Vitamine existierten nicht; soeben erst (1895) wurde es einigen Gelehrten bekannt, daß Oliver und Schäfer in Edinburgh mit einem Extrakt aus Nebennieren im Blutdruckversuch einen auffälligen Anstieg erhalten hatten. Auch die Auffindung des Jods in der Schilddrüse durch Baumann (1894) war noch nicht mehr als eine Merkwürdigkeit.

Dennoch wäre es falsch zu glauben, die Pharmakologie jener Zeit wäre arm an Stoff gewesen. Vielmehr hatte sie während des vorausgegangenen halben Jahrhunderts, im gleichen Schritt mit der lebendigen Entwicklung der experimentellen Physiologie, reichlich zu tun gehabt, um die Wirkungen zahlreicher pflanzlicher Produkte, vor allem der Alkaloide und

Glykoside, zu analysieren, die mehr und mehr in chemisch reiner Form zur Verfügung standen; natürlich wurde auch das Studium der anorganischen Verbindungen nicht versäumt. Was verschiedene Vorläufer, unter ihnen MAGENDIE und CLAUDE BERNARD, für Einzelfälle begonnen hatten, wurde von BUCHHEIM programmatisch und systematisch fortgeführt, unter der Führung SCHMIEDEBERGS, der auch bei CARL LUDWIG in die Schule gegangen war, an allmählich vermehrten eigenen Forschungsstellen in größerem Stile durchgearbeitet. Die „Analyse" der pharmakologischen Wirkungen hatte ja vor allem die primären „Angriffspunkte" in den vielgestaltigen Gewebselementen möglichst genau zu ermitteln und ihre Abstufungen nach den Dosen quantitativ festzulegen. Diese Untersuchungen hatten schon viel, auch grundsätzlich Wichtiges ergeben; als ein Beispiel sei SCHMIEDEBERGS Beobachtung über die Nikotinwirkung am Herzvagus aus dem Jahre 1870[4] erwähnt, die schon enthielt, was wir heute „Lähmung der Synapsen" nennen und was LANGLEY die Handhabe bot zur umfassenden Aufklärung der Anlage des autonomen Nervensystems[5].

Aber auch die *eigentliche* und letzte Aufgabe der Pharmakologie als erkennender Wissenschaft, d. h. die Ableitung der „Wirkungen" eines Stoffes aus seinen physikalisch-chemischen Eigenschaften, hatte naturgemäß die Gedanken und Anstrengungen der Forscher auf sich gezogen. An der bereits erwähnten Stelle hat STARLING für die von ihm in ihrer Bedeutung erkannten Hormone diese Aufgabe scharf charakterisiert: „Wenn wir alle im Körper wirksamen Hormone entdeckt haben werden und wenn uns die Aufdeckung ihrer chemischen Konstitution und ihre Synthese gelungen sein sollte, würde unsere Aufgabe nicht erschöpft sein. Wir hätten dann noch immer *die Art und Weise* zu ergründen, in welcher diese chemischen Substanzen ihre spezifische Wirkung auf das komplizierte Molekularaggregat, welches wir Protoplasma nennen, auszuüben vermögen. — Hier reichen sich Physiologie und Pharmakologie die Hände, und die älteste unter den Forschungen, die in Verbindung mit der Heilkunde erscheinen, nämlich jene, welche sich mit der Wirkung der Arzneikörper befaßt, wird uns vielleicht die Handhabe zur Aufklärung der fundamentalen Lebensprobleme liefern." Nun, Physiologie und Pharmakologie hatten sich schon längst in diesem Sinne die Hände gereicht, vor allem bei der Erforschung des Wirkungschemismus der Blutgifte, wie des Kohlenoxyds. Bezeichnenderweise gelang ein zweiter früher Vorstoß bis zu einer Theorie wiederum auf dem Gebiet der *anorganischen* Pharmaka, nämlich mit der Zurückführung der geringen Resorptionsgeschwindigkeit abführender Salze auf Salzkolloidbeziehungen durch FRANZ HOFMEISTER (um 1890).

[4] SCHMIEDEBERG: Ber. kgl. sächs. Akad. Wiss. Leipzig, Math.-physik. Kl. 1870, 130. — [5] Vgl. dazu Einzelheiten in diesem Heft S. 33.

III.

Freilich sollte sich schon um die Jahrhundertwende ein weiterer großer Fortschritt für eine wichtige Gruppe organischer Pharmaka zeigen in der Narkosetheorie von Hans Horst Meyer und Overton; wiederum zeigt die Nennung dieser beiden Namen, die ja nicht eine gemeinsame Arbeit, sondern zwei gleichzeitige voneinander gänzlich unabhängige Arbeiten mit gleichem Ergebnis anzeigen, daß die Kernfragen der Pharmokologie auch der Physiologie zugehören. Die Narkosetheorie ist im Laufe der vergangenen $4^1/_2$ Jahrzehnte nach allen Richtungen hin geprüft, vielfach bekämpft und ebenso verteidigt worden, aber immer wieder hat sie sich durchgesetzt, und zwar um so mehr, je reichlicher das Beobachtungsmaterial sich ansammelte und je feiner die Methoden wurden, die zur Anwendung kamen.

Für das Zustandekommen elektiverer Wirkungen hatte Paul Ehrlich eine Analogie mit den von ihm studierten Farben angenommen und glaubte im Eindringen, Anreichern und Haften an bestimmten Gewebselementen eine hinreichende Erklärung zu finden. Demgegenüber suchte Walther Straub schon in seinen jungen Jahren durch genaue quantitative Bestimmungen tatsächliche Aufklärung über das stoffliche Verhalten verschiedener Alkaloide zu erhalten. Dabei war er gewiß einer der ersten, die die abgestufte pharmakologische Wirkung selbst als *Maß* für quantitative Analysen ausnutzten. Er ermittelte, daß beträchtliche Speicherungen von Substanzen vorkommen können, die am Speicherungsort überhaupt keine pharmakologischen Wirkungen ausüben[6], ja er fand bei diesen Studien die bemerkenswerte Erscheinung, daß die Wirkung eines Giftes gerade dann aufhören kann, wenn die Anreicherung ihr Maximum erreicht hat, was ihn dann zu der „Potentialtheorie" für solche Pharmaka führte[7]. Tiefer in gewisse Formen des Wirkungschemismus hinein führten die Untersuchungen von Otto Warburg über die Wirkung der Blausäure und des Schwefelwasserstoffs auf eisenhaltige Fermente, von Hans von Euler und seiner Schule über die Wirkung der Edelmetalle Silber und Quecksilber auf die Saccharase u. a. m. Nach vielen Richtungen hin wurde das physikalisch-chemische, wie das chemisch-reaktive Verhalten zahlreicher Pharmaka durchstudiert, so daß heute schon eine ganze Reihe von Werken vorliegt, die dieser strengen theoretischen Seite der Pharmakologie gewidmet sind[8].

[6] Straub, W.: Arch. Fisiol. (It.) **1**, 55 (1903). — [7] Straub, W.: Pflügers Arch. **119** (1907). — [8] Zunz, Edgard: Eléments de Pharmacodynamie générale Paris 1930. — Clark, A. J.: Mode of action of drug on cells. London 1933. — General pharmacology, im Handbuch der experimentellen Pharmakologie (Erg.werk), Bd. 4. Berlin 1937. — Axmacher, Friedrich: Allgemeine Pharmakologie. Berlin 1938.

IV.

Der entgegengesetzte, gerade nach der praktischen Auswirkung gerichtete Pol dieses Wissenszweiges ist im Laufe des letzten halben Jahrhunderts weit weniger mit der Physiologie als mit der Chemie Hand in Hand gegangen. Auch dies versteht sich leicht aus der Natur der Sache selbst: Eine Entwicklung, die bis zur heutigen Bedeutung künstlicher Werkstoffe in Handwerk und Industrie geführt hat, konnte nicht gut an dem Gebiet künstlicher Wirkstoffe für die Hand des Arztes vorübergehen. Und selbst wo es eigentlich *physiologische* Erkenntnisse sind, die den Fortschritt der Arzneitherapie bedingen, wie auf den großen Gebieten der Hormone und Vitamine, erleben wir es ja in vielen Fällen, daß der praktische Nutzeffekt für die kranken Menschen erst dann einsetzt, wenn die Kunst des Chemikers eine relativ billige Synthese des Naturprodukts oder gar einen Ersatzstoff mit gleicher Wirkung gefunden oder erfunden hat. Vitamin D oder Testosteron sind wichtige Beispiele der ersten, Dioxyäthylstilboestrol, Desoxycorticosteron, Dihydrotachysterin (im „A. T. 10“, oder die Ersatzmittel für Vitamin-K-Beispiele der zweiten Leistung. Wer überdies die Arbeitsweise und die Erfolge der Institute von ADOLF BUTENANDT oder RICHARD KUHN betrachtet, die bis in die Geheimnisse der Befruchtungs- und Vererbungsvorgänge reichen, kann nicht verkennen, daß die dem chemischen Fachmann vorbehaltene Meisterschaft auch dem Physiologen fundamentale Forschungsgebiete aus der Hand genommen hat.

Gewiß bleiben einige höchst bedeutsame therapeutische Fortschritte der letzten Jahrzehnte übrig, bei denen die Medizin führend war und die Chemie ihre Rolle nur als Vollstreckerin des Auftrags zur Großfabrikation spielte, vor allem bei der Insulinbehandlung des Diabetes mellitus und bei der Leberbehandlung der perniziösen Anämie. Wo aber nur ein Spältchen sich öffnete für den Forschertrieb des Chemikers, wie bei der Herstellung von Depotinsulin, da drang er ein und trug zur Fortentwicklung bei. Wie hier, so war an zahlreichen anderen Stellen die Chemie erfolgreich im Sinne einer *Verbesserung* der bereits vorgezeichneten Therapie durch sinnvolle Abwandlung der Struktur des Pharmakons. Bei dem bereits erwähnten Vitamin K ist z. B. die Herstellung einer *wasserlöslichen* Verbindung („Synkavit“) statt der natürlichen fettlöslichen, die daher ohne Vermittlung der Galle zur Resorption kommt, für den Okklusionsikterus entscheidend wichtig. Ebenso war es bei der Insuffizienz der Sexual- oder Nebennierenhormone bedeutsam, Substanzen zu finden, die durch die Darm- oder Zungenschleimhaut oder durch die Haut resorbierbar waren oder die nach der Injektion oder Implantation höherer Dosen eine so allmähliche Abspaltung des wirksamen Moleküls (aus Estern) bedingten, daß die natürliche Dauerabgabe des Hormons ins Blut möglichst gut nachgeahmt würde. Auf der gleichen Linie liegt grundsätzlich der Ersatz des stoßartig wirkenden Adrenalins oder Azetylcholins durch die

langsamer abgebauten Derivate Sympatol, Veritol, Mecholyl, Doryl, Esmodil u. dgl.

Aber auch auf dem schon früher so gründlich bearbeiteten Gebiete der *pflanzlichen* Naturstoffe hat das jüngste Halbjahrhundert neue Kenntnisse und damit Erweiterungen der therapeutischen Möglichkeiten gebracht. Von den vorher bereits bekannten Alkoloiden wurden das Chinidin, das Papaverin, das Emetin und das Ephedrin der Therapie nutzbar gemacht, das Lobelin durch Heinrich Wieland mit dem gleichen praktischen Erfolg rein dargestellt. (Geringere Bedeutung haben Mezkalin, Bulbocapnin, Harmin und Yohimbin.) Auf zwei äußerst schwierigen Gebieten, nämlich den Alkaloiden des Mutterkorns und den Glykosiden der Digitalis, wurde endlich durch Arthur Stoll „reiner Tisch" gemacht und das Wesentliche ihres chemischen Aufbaus klargestellt. Die praktische Konsequenz war die Einführung so wichtiger Arzneimittel wie des Ergotamins und Ergometrins, des Cedilanids und des Strophanthosids. Freilich ist für die Digitalistherapie viel wesentlicher noch der Fortschritt gewesen, den zu Beginn des 20. Jahrhunderts der Arzt Albert Fraenkel mit der intravenösen Verwendung des „halbreinen" K-Strophanthins einleitete und in den folgenden Jahrzehnten ausbaute. Auch die Herstellung weniger definierter Präparate mit biologisch eingestelltem Wirkungswert, wie Digalen, Digipurat, Verodigen usw. hat gegenüber den früheren Behandlungsformen Vorteile gebracht. Künstliche Abwandlungen der Struktur von Naturstoffen in der Hoffnung auf Verbesserung der Wirkung sind auch hier wieder zu verzeichnen. Mag man auch in der Morphingruppe recht zweifelhaft sein, ob Präparate wie Dilaudid, Dicodid, Paracodin, Eukodal, Acedicon eine ernstliche Erweiterung der therapeutischen Möglichkeiten gebracht haben, mag man auch von der Überlegenheit des Eupaverins über Papaverin, des Eumydrins über Atropin nicht völlig überzeugt sein, so ist ohne Zweifel mit der Überführung des Hydrochinins in Optochin eine neue Wirkung — gegenüber Pneumokokken — erzielt worden. Weiterhin ist in der Struktur des Plasmochins und schließlich auch des Atebrins noch eine gewisse, wenn auch schwache Anlehnung an das natürliche Vorbild Chinin erkennbar. Ein analoges Verhältnis darf man mit gutem Willen beim Dolantin gegenüber Morphin konstatieren. Noch deutlicher bewahren die Lokalanästhetica Psicain, Novocain, Larocain, Tutocain, Pantocain nicht nur im Namen, sondern auch im Aufbau ihre grundsätzliche Verwandtschaft zum Cocain. Cotarnin (im „Stypticin") wurde dem Naturprodukt Hydrastinin, Prostigmin dem Physostigmin (Eserin) nachgebildet. Außerhalb der Reihe der Alkaloide begegnet uns das campherähnliche Hexeton, das apiolähnliche Gravitol u. a.

V.

Die unermüdliche synthetische Tätigkeit der Chemiker hat uns auch Funde beschert, die *überraschend* waren, weil sie an kein Vorbild

anknüpfen konnten, keinem noch so entfernten Analogon an die Seite treten. Wohl kein Chemiker und kein Pharmakologe hätte vorausahnen können, daß die chemische Struktur, die uns im Cardiazol geläufig geworden ist, eine so eindeutig nützliche Wirkung am Krankenbett besitzen würde. Gleiches gilt vom Coramin (Cormed), sowie einer Reihe spasmenlösender Basen, von denen als Beispiel das Octin genügen dürfte. Auch die interessanten zentralen Wirkungen des Ephedrins und erst recht des Benzedrins und Pervitins waren unverhoffte Geschenke der Natur, wenn auch die Substanzen selbst um ihrer peripheren Wirkungen willen gesucht wurden. Analoges bietet die Gruppe der organischen Quecksilberverbindungen, die ursprünglich als Antisyphilitica erprobt wurden, ehe sie (vom Novasurol zum Salyrgan und Novurit) als hervorragende Diuretica geradezu „entdeckt" wurden, und dies trotz der älteren Erfahrungen über die diuretische Wirkung des Kalomels. Es ist interessant, daß das ältere Diuretin — wie schon der Name kundgibt —, wie das neuere Euphyllin u. a. anfangs nur als Diuretica dienten, ehe sie ihre heutige Bedeutung bei Gefäßspasmen erlangten. Atophan wurde eingeführt und erhielt seinen Namen, weil es die Ausscheidung der Harnsäure erhöht; später bemerkte man, daß sein wesentlicher Wert in seiner analgetischen und antiphlogistischen Wirkung liegt. Die für den Heilprozeß von Geschwüren günstige Hyperämie durch Follikelhormon, die besondere sedative Qualität des Luminals, die Brauchbarkeit des Cardiazols und des Insulins bei der Schizophrenie sind *sämtlich nachträglich* beim therapeutischen Gebrauch erkannt worden.

Diese wenigen Beispiele belegen von neuem, wie unmöglich es ist, auf pharmakotherapeutischem Gebiete *Voraussagen* zu machen, die über vage Vermutungen hinausgehen. Viele Laien auf pharmakologischem Gebiete, zu denen zahlreiche Chemiker und nicht wenig Ärzte gehören, halten an dem Wunschtraum fest, man könne bestimmte therapeutische Effekte vorausberechnen. Durch die plastische und eindringliche Sprache PAUL EHRLICHS ist wohl zu seiner Zeit dieser Glaube noch genährt worden, den dieser große und erfolgreiche Optimist selbst zu teilen schien. In Wahrheit hat EHRLICH auf dem pharmakotherapeutischen Gebiet nichts anderes getan, wie viele weniger erfolgreiche Forscher, nämlich *probiert*. Sein Ausgangspunkt, das Atoxyl, hatte sich THOMAS in England ebenfalls beim Probieren als nützlich bei Trypanosomeninfektionen erwiesen und die Entwicklung des Salvarsans war der Schlußstein einer Kette jahrelanger mühseligster Arbeiten, deren Wesen nur ein Herumtasten war. Nicht viel anders ist der Glücksfund von LEVADITI zu beurteilen, der die Einführung des Wismuts in die Syphilistherapie zur Folge hatte. Auch die neueste Frucht auf dem Gebiete der antiparasitären Therapie, die Sulfonamide, war ein Gnadengeschenk, das kein menschlicher Geist voraussehen konnte. Es ist ja äußerst charakteristisch, wie nach Bekanntgabe

der ersten grundsätzlichen Beobachtungen und Erfahrungen sich geradezu eine Welt von Forschern in allen Ländern darauf gestürzt hat, dies Grundsätzliche nach allen Richtungen hin durchzuarbeiten und diese und jene Verbesserung für die praktische Auswirkung dazuzugeben, was gewiß nicht ohne jeden Erfolg blieb, aber doch niemals Domagks erster Beobachtung commensurabel sein kann. Und es ist nicht minder charakteristisch, daß die Sulfonamide als chemische Substanzen lange bekannt waren, ohne daß man etwas von ihren so sehr bemerkenswerten „Wirkungen" ahnte. Endlich wird die Unsicherheit bei dem Herumtappen um eine pharmakologische Wirkung sehr eindrucksvoll dadurch beleuchtet, daß die Bedeutung der Sulfamino- oder Sulfogruppen für den charakteristischen Effekt den vereinten Chemikern und Biologen keineswegs von vornherein klar war.

Trotz dieser Beurteilung demonstrieren die erzielten Erfolge aufs Schlagendste den Nutzen des unablässigen, selbst planlosen Herumprobierens; es heißt nicht umsonst in der Bibel: „Suchet, so werdet ihr finden."

VI.

Es erübrigt sich, irgendeine Vollständigkeit in Bezug auf die seit 5 Jahrzehnten neu eingeführten Arzneimittel anstreben zu wollen, um so mehr als manche von ihnen wieder verschwunden sind. Auch bedarf es keiner längeren Ausführungen darüber, daß überall auch die Kleintechnik der Applikation Fortschritte gemacht hat, wofür als Beispiele die Stichworte Acidol, Solvochin, Filmaronöl, Dijodyl, Kalziumglukonat dienen mögen.

Über das Gebiet der Arzneitherapie hinaus sind noch mancherlei sonstige Entwicklungen zu nennen, die für die Pharmakologie bedeutsam wurden. Die Toxikologie ist durch die Einführung zahlreicher gesundheitsschädlicher Stoffe in die Technik, besonders von „Lösungsmitteln" erheblich erweitert worden. Die Anwendung von „Kampfgasen" im Kriege hat einen Zweig der Toxikologie aufblühen lassen, der auch recht interessante allgemein-pathologische Fragen gefördert hat. Die Entdeckung Röntgens hat den Gebrauch von Röntgenkontrastmitteln mit sich gebracht und damit Probleme der Verhütung „medizinaler" Vergiftungen. Die Entdeckung der Radioaktivität warf weitere „toxikologische" Probleme auf, hatte aber auch methodische Fortschritte für die Aufklärung von Vergiftungen durch Uran oder Blei im Gefolge.

VII.

Alle diese Momente, am meisten wohl die völlig neuen Gebiete der Chemotherapie, der Hormon und Vitamintherapie, auch der „Reiz"- und Serumtherapie, haben das Schwergewicht der „Materia medica"

im Laufe des letzten halben Jahrhunderts beträchtlich verschoben und damit naturgemäß auch den Schwerpunkt für die Wissenschaft Pharmakologie. Ist sie doch selbst dauernd beteiligt gewesen an der angedeuteten Entwicklung. Natürlich ist im Experiment, dem wesentlichsten Mittel der pharmakologischen Forschung, nicht jede therapeutische Wirkung reproduzierbar: Man denke an Haut- oder Geisteskrankheiten oder auch nur an die so eklatante Jodwirkung bei der tertiären Lues. Aber im ganzen ist ja das moderne Tempo in der Einführung neuer Arzneimittel, die mit sehr viel Wust eben auch höchst wertvolle Verbesserungen bringt, völlig undenkbar ohne das kontrollierende Filter des Tierexperiments, das in erster Linie so viel als möglich jede Gefahr auszuschließen hat, weiter aber auch die ersten gröberen Hinweise auf den Wirkungstypus gibt. Hier wird jahraus jahrein an zahlreichen Forschungsstätten eine stille, nur selten gelohnte und wenig ruhmreiche Arbeit geleistet, ohne die dennoch jeder Fortschritt auf pharmakotherapeutischem Gebiete mit viel höheren Menschenopfern erkauft werden müßte.

Nur ein Teil dieser Arbeit bestand in der Auffindung von Methoden, die eine *quantitative* Bewertung solcher Substanzen erlaubten, die noch nicht oder überhaupt kaum jemals mit der Waage gemessen werden können, also z. B. Hormone von Eiweißnatur. Auch diese biologischen Auswertungen sind natürlich für den therapeutischen Erfolg ausschlaggebend, wofür das Insulin wohl das bekannteste Beispiel liefert. Sie haben übrigens, am ausgiebigsten in England (TREVAN, BURN u. a.), zu sehr wichtigen allgemein-biologischen Erkenntnissen über die Streuung bestimmter Eigenschaften unter den Individuen einer Art geführt.

Ein weiteres Sonderkapitel praktischer Auswirkung pharmakologischer Forschung sind die Kombinationswirkungen. An Stelle der in der Natur, z. B. im Mohnsaft, im Mutterkorn zu findenden ungleichmäßigen Mischungen verschiedener wirksamer Stoffe hat die wissenschaftliche Behandlung systematisch bestimmte Kombinationen von zwei oder mehr Einzelsubstanzen in bestimmtem Mengenverhältnis herausgearbeitet, denen nun genau zu bezeichnende und jederzeit beweisbare Vorteile vor jeder einzelnen Substanz zukommen. Dahin gehören die Lokalanästhetica mit Adrenalinzusatz, Veramon (und wohl auch manche ähnliche Kombinationspräparate), Bellergal, Eupaco, Narcophin (auch wohl Laudanon und Pantopon), Asthmolysin, Tenosin, Neo-Gynergen, Scopolamin-Eukodal-Ephetonin (Scophedal) u. a. Eine theoretische Ordnung der zahlenmäßigen Dosenbeziehungen bei Kombinationen versuchte BÜRGI zu finden.

Weitere umfangreiche Bemühungen der Pharmakologen bezogen sich naturgemäß auf das intimere Eindringen in die Wirkungsweise der verschiedenen Pharmaka, obwohl sie — wie oben erwähnt — bei diesen Bemühungen niemals allein gestanden haben. Es ist kein Zweifel, daß sehr erhebliche Fortschritte überall da erzielt werden konnten, wo registrierende

Verfahren Anwendung fanden, wodurch sich erklärt, daß die Pharmakologie des Kreislaufs, des Darmkanals und des Bewegungsapparates über ein besonders reiches Erkenntnismaterial verfügt. Hier liegt auch das Schwergewicht dessen, was Walther Straub und seine immer wachsende Schule im Laufe von 4 Jahrzehnten seiner Wissenschaft geschenkt hat.

Überdies darf erwähnt werden, daß einige Pharmakologen der Physiologie rückerstattet haben, was ihre eigene Wissenschaft von ihr empfangen durfte, insofern sie, ausgehend von Fragen der Wirkungsweise gewisser Mittel bis zur Aufklärung physiologischer Probleme und Entdeckung neuer physiologischer Tatsachen vordrangen: Es genügt zu erinnern an den Nachweis des „Vagusstoffes" und des „Sympathicusstoffes" durch Otto Loewi, an das Studium der Darmbewegungen und der Stellreflexe durch Rudolf Magnus, der zentralen Wärmeregulation durch Hans Horst Meyer, des Sinus caroticus durch Jean François und Corneille Heymans, der Rezeptorenfelder an der Herzbasis durch Adolf Jarisch, des Herzstoffwechsels durch Hans Gremels.

VIII.

Betrachtet man als Pharmakologe den gesamten Ablauf der medizinischen und überhaupt der biologischen Wissenschaften im letzten halben Jahrhundert, so kann man sich des Eindrucks nicht erwehren, daß ihr Inhalt allenthalben „pharmakologischer" geworden ist. Was im Anfang dieses Zeitraums noch als eine Besonderheit in Einzelfällen erschien, das in den Gesichtskreis des Menschen höchstens im Falle einer Erkrankung oder gar Vergiftung trat, entpuppt sich mehr und mehr als ein *grundsätzliches,* allgemein verwendetes Verfahren der belebten Natur: Nämlich die Einführung bestimmter chemischer Substanzen in bestimmter Menge und zu bestimmten Zeiten in das Getriebe eines lebendigen Systems mit dem Erfolge einer *Abänderung* seines bisherigen Zustandes. Sämtliche Hormone regeln Funktionen durch Mechanismen oder Chemismen, die nichts anderes sind als „pharmakodynamische", und in den Nerven werden wir vielleicht bald nichts anderes mehr zu sehen haben als vorgebildete Straßen, auf denen solche körpereigenen Pharmaka zur Stelle der Wirkung hineilen. Selbst die Kopulation einzelliger Organismen bedient sich pharmakodynamischer Stimulantien und die Krümmung eines pflanzlichen Triebes wird von der Dosis eines Wuchsstoffes beherrscht. Im Gebiete der Pathologie gibt es Hyper- und Hypovitaminosen und neben den bakteriellen Giften spielen körpereigene, z. B. Histamin, eine beträchtliche Rolle. Die Erzeugung von bösartigen Geschwülsten kann heute als pharmakologische Erscheinung behandelt werden und zeigt sich wie andere dieser Art als abhängig von der chemischen Struktur und der Dosis der „Pharmaka". Mehr und mehr wird somit die „Wirkungsweise" zu einem allgemeinen Problem biologischer und pathologischer Erkenntnis. Was

Schmiedeberg und Starling prophetisch voraussahen, wird täglich klarere Wirklichkeit: „Pharmakologie" — nicht im Sinne eines abgegrenzten Lehrfachs oder Lehrbuchs — aber im Sinne ihres eigentlichen Inbegriffs rückt tief ins zentrale Gebiet aller Lebensforschung. Und damit bleibt sie selbst „lebendig".

Es hat im Verlaufe des letzten halben Jahrhunderts Zeiten gegeben, in denen die Pharmakologie als sterbend erklärt wurde. Als die Immunologie und Therapie alle Gemüter beherrschte, gab es Gelehrte medizinischer Fächer und hochgestellte Ministerialbeamte, die die Pharmakologie als obsolet ansahen und den Gedanken erörterten, ihre Lehrstühle abzuschaffen und ihre Institute anderen Fächern zur Verfügung zu stellen: Ein interessantes Beispiel für die psychologische Gewalt temporärer Interessenrichtungen auch gegenüber hervorragenden Geistern. In Wirklichkeit hat die Gedankenwelt, die wir „Pharmakologie" nennen, ihre Lebenskraft bewahrt, ja geradezu in prägnantester Weise die charakteristischen Merkmale des *Lebendigen* aufgewiesen, nämlich die Kombination von Selbstbehauptung mit Anpassung, wie sie schon Goethe in einer seiner nachgelassenen Reflexionen formuliert hat: „Das Lebendige hat die Gabe, sich nach den vielfältigsten Bedingungen äußerer Einflüsse zu bequemen, und doch eine gewisse errungene entschiedene Selbständigkeit nicht aufzugeben."

Historische Notiz über die Entdeckung der Synapsen im autonomen Nervensystem mit Hilfe des Nikotins.

Von

Wolfgang Heubner.

(Eingegangen am 15. April 1946.)

In manchen Hand- und Lehrbüchern wird die Entdeckung der eigentümlichen Wirkung des Nikotins an den „Umschaltestellen" oder Synapsen des autonomen Nervensystems und die damit verknüpfte Entdeckung dieser Gebilde selbst ausschließlich I. N. Langley zugeschrieben, der allerdings das Verdienst hat, zuerst in seiner Arbeit mit Dickinson[1] diese Befunde an *sympathischen* Ganglien ermittelt und weiterhin zu einer Gesamtschau über die Anlage des autonomen Nervensystems ausgebaut zu haben. Doch war er keineswegs der erste, der *überhaupt* diese charakteristische Nikotinwirkung und die betroffenen nervösen Gebilde erkannt und beschrieben hat, dies war vielmehr 20 Jahre vor ihm Oswald Schmiedeberg. Offenbar ist dies oft vergessen worden, weil Langley ihn nicht zitiert; auch Dixon tut dies nicht in einer Monographie über Nikotin für Heffters Handbuch der experimentellen Pharmakologie[2], obwohl er Schmiedebergs Schüler Truhart[3], sowie einen anderen, schon von Schmiedeberg angeführten Autor A. B. Meyer[4] nennt. Schmiedeberg selbst hatte sich gegen die Ignorierung seiner Arbeit zur Wehr gesetzt, allerdings erst in der 7. Auflage seines Grundrisses der Pharmakologie 1913, wo er gegen eine Angabe von F. Marchand und A. W. Meyer[5] seine Priorität vor Langley und Dickinson vertritt[6]. Auch Hans Horst Meyer erkennt in seinem Nachruf auf Schmiedeberg[7] diesen Anspruch an: „Diese Untersuchungen haben auch das Vorhandensein eines nikotinempfindlichen Zwischenstücks zwischen Vagusnerv und seiner letzten Endigung erwiesen, des später als Synapse erkannten Gebildes." Die Arbeit Schmiedebergs, in der er Befunde seines Doktoranden Truhart erweitert und auswertet, verdient im Interesse der historischen Gerechtigkeit nach 75 Jahren wieder der Vergessenheit entrissen zu werden[8].

Vorher hatte bereits Ludwig Traube[9] an Hunden gefunden, daß Nikotin eine vorübergehende Erregung und folgende Lähmung des „regulatorischen Nervensystems" (Hemmungsapparates) des Herzens setzt, und daß die erregende Phase auch nach Durchschneidung der Vagusstämme noch nachweisbar ist[10]. Zur Erklärung dieser Erscheinung nahm er an,

daß das Nikotin „die von dem Zentrum des regulatorischen Herznervensystems abgetrennten Vagusenden oder vielmehr *einen mit diesen Enden in Verbindung stehenden gangliösen Teil des Hemmungsapparates* zu erregen vermag". J. ROSENTHAL[11] bestätigte die Befunde von TRAUBE am Froschherzen (bei dem es bekanntlich bis zum Stillstand des Herzens kommt) und folgerte, daß „der Stillstand bedingt sein muß durch eine Erregung der Vagusfasern innerhalb des Herzens, ein Schluß, zu dem schon TRAUBE durch seine Versuche gelangt war".

In SCHMIEDEBERGS Arbeit werden die von TRAUBE und ROSENTHAL erhobenen Befunde bestätigt und dahin erweitert, daß Atropin die erregende Phase verhindert und daß nach Eintritt der lähmenden Wirkung zwar die elektrische Vagusreizung ohne Effekt bleibt, Muscarin aber dennoch einen durch Atropin aufhebbaren Stillstand herbeiführt. Daraus wird geschlossen, daß „durch das Nikotin andere Teile des Vagus gelähmt werden als durch das Atropin und diese dem Stamme des Vagus näher liegen als jene, auf welche das Atropin wirkt". Die Analogie der Muscarinwirkung bei Nikotingegenwart mit dem durch A. B. MEYER[4] festgestellten Erfolg der elektrischen Reizung des Venensinus wird hervorgehoben. „Die eigentlichen Hemmungsvorrichtungen im Herzen werden also durch das Nikotin nicht gelähmt, nur die Zuleitung der Erregung vom Stamme her wird unterbrochen, indem die vor jenen Vorrichtungen liegenden Teile unerregbar werden." Unter überzeugend begründeter Ablehnung der Möglichkeit, daß nervöse *Fasern* selbst in Betracht kommen könnten, fährt SCHMIEDEBERG fort: „Es läßt sich schließen, daß die hemmenden Fasern im Vagus durch Nikotin nicht gelähmt werden, daß sich vielmehr die Wirkung dieses Giftes auf Teile erstreckt, die von den Nervenfasern verschieden sind und vorläufig als Zwischenapparate bezeichnet werden können, die den Zusammenhang des Endapparates mit den Vagusfasern ermitteln." Klarer läßt sich kaum aussprechen, daß SCHMIEDEBERG für den Herzvagus des Frosches vollständig richtig erkannt hat, was später durch LANGLEY als allgemeine Regel im ganzen autonomen System des Warmblüters demonstriert wurde. SCHMIEDEBERGS Erfolg ist einem besonders schönen Beispiel vortrefflicher experimenteller und scharfsinniger gedanklicher Analyse zu danken.

Übrigens enthält die gleiche Arbeit auf ihren 10 Seiten kleinen Formats zwei weitere wichtige Entdeckungen: erstens den Nachweis, daß die Acceleransfasern beim Frosch im Vagusstamm verlaufen, zweitens die den autonomen Nerven eigentümliche zögernde Reaktion. Beides zeigte sich nach Ausschaltung der Hemmungsbahn durch Nikotin. SCHMIEDEBERG schreibt zu dem zweiten Befund: „Diese lang dauernde Nachwirkung und latente Reizung sind bisher im Gebiete der Nervenphysiologie ohne Analogie. Vielleicht würden die Hemmungsfasern des Frosches ähnliche Verhältnisse bieten, wenn es möglich wäre dieselben zu reizen, ohne daß

gleichzeitig die beschleunigenden Fasern erregt würden." Er fügt hinzu, daß ein Gift zu deren elektiver Ausschaltung „sich bisher nicht finden ließ". Wiederum eine seltene Schärfe und Weite des Blickes!

Endlich griff SCHMIEDEBERG in dieser Arbeit noch in eine physiologische Streitfrage ein: Durch Anwendung von Atropin wies er nach, daß der nach Abtrennung des Venensinus eintretende Stillstand des Froschherzens nicht eine Hemmung durch Vagusreizung ist, sondern eine Ausschaltung der reizerzeugenden Zentren.

Den Nachfahren mag ein Gefühl des Neides anwandeln vor der Ergiebigkeit des jungfräulichen wissenschaftlichen Bodens, auf dem in kurzer Frist so reich geerntet werden konnte. Doch gebührt ihm mehr noch die Ehrfurcht vor der Meisterschaft, die mit einfachsten Mitteln diese Schätze der Erkenntnis zu bergen und zu werten vermochte.

Literatur.

[1] LANGLEY u. DICKINSON: Proc. roy. Soc., Lond. **46**, 423 (1889). — [2] DIXON: In HEFFTERS Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. 2, S. 669, 1924. — [3] TRUHART: Ein Beitrag zur Nicotinwirkung. Diss. Dorpat 1869. — [4] MEYER, A. B.: Hemmungsnervensystem des Herzens. Berlin 1869. — [5] MARCHAND, F. u. A W. MEYER: Pflügers Arch. **145**, 401 (1912). — [6] SCHMIEDEBERG: Grundriß, 7. Aufl. S. 191. 1913. — [7] MEYER, H. H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **92**, V (1922). — [8] SCHMIEDEBERG, O.: Ber. kgl. sächs. Wiss. **22**, 130 (1870). — [9] TRAUBE, LUDWIG: Med. Centralzeitung **31**, 821 (1862); **32**, 65 (1863). — [10] Nach A. W. FORST kommt diese anfängliche Erregungswirkung nicht dem *reinen* Nikotin, sondern einer Verunreinigung, vermutlich seinem Oxydationsprodukt *Nicotyrin* zu: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **201**, 265 (1943). — [11] ROSENTHAL, J.: Zbl. med. Wiss. **1**, 737 (1863).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Hamburg.

Über das Wesen der Cholesterinolyse.

Von

Ed. Keeser.

(Eingegangen am 27. April 1944.)

In Ergänzung unserer bereits veröffentlichten Befunde über den Cholesterinstoffwechsel[1] untersuchten wir noch eine Reihe weiterer Substanzen auf ihren Einfluß auf die Cholesterinolyse des Blutes. Von den hierbei erhaltenen Ergebnissen seien nur die nachfolgenden ihres praktischen Interesses wegen mitgeteilt:

Cholesterinolyse in 5 ccm Hundeserum (in vitro).

Zugesetzte Substanz	Cholesterinolyse in mg-% nach 48 Std. bei 37° C	
	ohne Zusatz	mit Zusatz
0,5 g Kaliumjodid	0,0	+ 11,64
25 mg Dijodtyrosin	0,0	— 5,82
25 mg Dijodtyrosin	— 8,73	— 11,6
0,5 ccm Elityran	— 8,73	+ 11,64
0,5 mg Thyroxin	+ 23,28	+ 29,10
5,0 mg Natriumnitrit	— 11,64	— 46,56
1 Tropfen Nikotin	— 11,64	— 23,28
1000 M.-E. Radiumemanation	0,0	+ 17,46

Da es nun nicht nur bei der Arteriosklerose, sondern auch bei der Entstehung von Gallensteinen zu einer Ablagerung von Cholesterin bzw. Konkrementbildung kommt, lag es nahe zu prüfen, ob auch die Galle ein cholesterolytisches Vermögen besitzt und dieses beeinflußbar ist. Die von Urbach, Bohn und Bickenbach[2] zur Bestimmung des Cholesterins im Serum angegebene Methode wurde für die Bestimmung des Cholesterins in der Galle von uns in folgender Weise angewandt:

10 ccm durch Seitz-Filter sterilisierte Galle wurden mit 0,2 g fein zermörsertem Cholesterin versetzt, 48 (oder 72) Stunden im Brutschrank gelassen und während dieser Zeit mehrmals kräftig umgeschüttelt. Hierbei ist sorgfältig darauf zu achten, daß alle Ansätze gleichmäßig stark und lang (Stoppuhr) geschüttelt werden. Darauf wird die Galle durch ein

[1] Keeser, Ed.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **198**, 536, 638 (1941). — Dtsch. Z. Verdgs.- u. Stoffw.krkh. 8, H. 1 (1944). — [2] Urbach, Bohn u. Bickenbach: Klinische Kolorimetrie mit dem Pulfrich-Photometer.

trockenes Filter filtriert. Nunmehr werden 2 ccm Galle in einem Scheidetrichter 6mal mit je 15 ccm Chloroform ausgeschüttelt. Auch dieses Ausschütteln muß genau nach der Stoppuhr erfolgen (2 Min.). Dann wurde nach der Originalmethode weitergearbeitet. Die genaue Einhaltung dieser Methodik ist erforderlich, da andernfalls — vermutlich bedingt durch die unterschiedliche Viskosität der Galle — voneinander abweichende und nicht vergleichbare Ergebnisse erhalten werden.

Fügten wir je zu 10 ccm Galle die nachstehend genannten Substanzen in den angegebenen Mengen, so ergab sich folgendes:

Zugesetzte Substanz	Cholesterinolyse in mg-% nach 48 Std. bei 37° C	
	ohne Zusatz	mit Zusatz
1 mg KCN	+ 263,06	+ 214,75
1 mg Na_2S	+ 263,06	+ 213,59
10 mg Atophan	+ 263,06	+ 242,70
50 mg $CaCl_2$	+ 221,16	+ 212,43
50 mg $MgCl_2$	+ 221,16	+ 238,62
10 mg Chlorophyll	+ 221,16	+ 210,68
50 mg Theobromin	+ 335,65	+ 361,84
1000 M.-E. Radiumemanation	+ 180,42	+ 190,90
2,5 ccm Chophytol (5%ige Lösung)	+ 180,42	+ 186,24

Die untersuchten Substanzen beeinflußten somit die Cholesterinolyse in der Galle in derselben Weise wie im Blute; besonders auffallend ist der auch hier wieder zu beobachtende Antagonismus von Calcium und Magnesium.

Weiter wurde gefunden, daß das cholesterolytische Vermögen der Galle durch Kochen nicht zerstört wird. Somit kann es sich bei der Cholesterinolyse nicht um einen fermentativen Prozeß handeln. Daher prüften wir weiter, ob sie von der Viskosität der Galle abhängt. Zu diesem Zweck wurden zu je 50 ccm Galle 2,5 g $MgCl_2$ bzw. $CaCl_2$ zugesetzt und mit dem Viskosimeter nach HÖPPLER untersucht, ob durch diesen Zusatz von Substanzen, die die Cholesterinolyse in entgegengesetztem Sinn beeinflussen, auch die Viskosität unterschiedlich geändert würde. Letztere zeigte jedoch keinen Unterschied gegenüber Galle, der nichts zugesetzt worden war. Desgleichen konnte stalagmometrisch unter den genannten Versuchsbedingungen eine Änderung der Oberflächenspannung nicht festgestellt werden.

Aus diesen Versuchsergebnissen schlossen wir, daß bei der Cholesterinolyse physikochemische Prozesse eine Rolle spielen. Um dies zu prüfen, stellten wir zunächst ein 50 mg%iges Cholesterinsol in RINGER-Lösung her, gaben zu je 9 ccm dieses Sols 1 ccm der nachstehend genannten m/10-Salzlösungen und erhielten bei der 24 Stunden später vorgenommenen Bestimmung des Cholesterins folgendes:

Natrium, Magnesium und Calcium fällten unter den angegebenen Versuchsbedingungen Cholesterin zunehmend stark, eine Cholesterinolyse, d. h. Lösung von Cholesterin, das als Bodenkörper den Ansätzen zugesetzt wurde, erfolgte nicht. Zudem kann die fällende Wirkung der genannten Kationen deswegen nicht die Ursache für die unterschiedliche Löslichkeit des Cholesterins im Blute sein, weil bei Zusatz von 50 mg Theobromin. Natr. salicylic., 30 mg Eupaverin oder 1 ccm Chophytol, also Stoffen, die nach unseren bereits mitgeteilten Versuchen das cholesterolytische Vermögen erhöhen, zu einem Cholesterinsol nach 24 Stunden der Cholesteringehalt in allen Ansätzen derselbe war.

Zugesetzte Substanz	Cholesterin in mg-%
NaCl	11,06
$MgCl_2$	9,31
$CaCl_2$	5,82

Da nach Bennhold[3] Cholesterin mit dem Globulin eine Bindung eingeht, wurde weiter ein 0,25%iges Globulinsol in Ringer-Lösung hergestellt, das außerdem, als Sol gelöst, 25 mg-% Cholesterin enthielt. Je 9,5 ccm dieses Sols wurden je 0,5 ccm einer m/10-Lösung von NaCl, $MgCl_2$ oder $CaCl_2$ zugesetzt. Bei ihrer 24 Stunden später erfolgenden Untersuchung zeigten diese Ansätze keinerlei Unterschied in ihrem Gehalt an Cholesterin sowie kein cholesterolytisches Vermögen.

Wurden dagegen einem etwa 0,25%igen Albuminsol in Ringer-Lösung, das außerdem, als Sol gelöst, 50 mg% Cholesterin enthielt, je 0,5 ccm einer m/10-Lösung von NaCl, $MgCl_2$ oder $CaCl_2$ ohne und mit Cholesterin als Bodenkörper zugefügt, so ergab sich bei der 24 Stunden später erfolgenden Untersuchung regelmäßig ein Befund nachstehend genannter Art:

Zusatz	Cholesterin in mg-%	
	ohne Cholesterin als Bodenkörper	mit Cholesterin als Bodenkörper
Aqua dest.	13,39	13,97
NaCl	14,55	14,55
$MgCl_2$	16,88	17,00
$CaCl_2$	12,55	12,55
Aqua dest.	12,80	12,80
50 mg Theobromin	16,30	16,46
30 mg Eupaverin	18,82	18,82
50 mg Papaverin	12,80	12,80

Die Löslichkeit von Cholesterin war somit unter den geschilderten Bedingungen bei Zusatz von Mg größer als bei dem von Na sowie bei dem von Ca am kleinsten. Eine Cholesterinolyse fand jedoch bei Zusatz eines dieser Kationen ebensowenig statt wie bei dem von Theobromin, Eupaverin oder Papaverin. Bemerkenswert ist indessen, daß die Löslichkeit des

[3] Bennhold: Die Eiweißkörper des Blutplasmas. Dresden: Theodor Steinkopff.

Cholesterins durch die genannten Substanzen in diesen Modellversuchen in derselben Weise beeinflußt wird, wie es im Blute der Fall ist.

Wurden je 9,5 ccm 50 mg-%iges Lecithinsol in RINGER-Lösung, das außerdem 25 mg-% Cholesterin, als Sol gelöst, enthielt, je 0,5 ccm einer m/10-Lösung der nachstehend genannten Salze zugesetzt, so ergab sich nach Abzug des Cholesterinwertes, den das reine Lecithinsol enthielt, folgendes:

Zusatz	Cholesterin in mg-%	
	ohne Cholesterin als Bodenkörper	mit Cholesterin als Bodenkörper
Aqua dest.	32,01	32,01
NaCl	32,01	32,01
$MgCl_2$	25,03	25,03
$CaCl_2$	20,37	11,64

Die Löslichkeit des Cholesterins nahm somit in der Reihenfolge Na > Mg > Ca ab; eine Cholesterinolyse war nicht zu beobachten; bei Zusatz von Ca und Cholesterin als Bodenkörper erfolgte sogar verstärktes Ausfallen von Cholesterin.

Das bisher erhaltene Bild änderte sich jedoch, wenn ein 50 mg-%iges Cholesterinsol in einer 0,1%igen Lösung von Natriumpalmitat verwendet wurde. Wurden zu je 9 ccm dieses Sols je 1 ccm einer m/10-Lösung der genannten Salze zugesetzt, so wurden bei der 24 Stunden später erfolgenden Bestimmung des Cholesterins z. B. folgende Werte erhalten:

Zugesetztes Salz	Cholesterin in mg-%	
	ohne Cholesterin als Bodenkörper	mit Cholesterin als Bodenkörper
NaCl	23,28	37,83
$MgCl_2$	34,83	45,40
$CaCl_2$	26,19	41,90
Aqua dest.	11,64	37,83
25 mg Theobromin	29,60	52,38
7 mg Eupaverin	39,58	43,65
1 ccm Chophytol	27,94	37,83
Aqua dest.	9,31	—
50 mg Cholsäure	8,73	—
50 mg Theobromin	29,10	—
50 mg Papaverin	9,31	—
7 mg Eupaverin	24,44	—

Bei diesen Modellversuchen wurden somit die gleichen Ergebnisse erhalten, die in den bereits veröffentlichten Untersuchungen über die Beeinflussung der Cholesterinolyse im Blute sowohl in vitro wie auch in vivo gefunden worden waren: Dieselben Stoffe, die im Blute die Cholesterinolyse erhöhten, erniedrigten oder nicht beeinflußten, tun dies auch unter den angegebenen Bedingungen der Modellversuche.

Aus diesen Untersuchungen ergibt sich somit, daß die cholesterolytische Fähigkeit an die Fettsäuren bzw. Seifen gebunden ist. Für die Therapie ergibt sich aus diesen Versuchen folgendes:

1. Soll die Cholesterinolyse des Blutes lediglich mit Hilfe der in ihm bereits vorhandenen Fettsäuren erhöht werden, so müssen Stoffe wie Magnesium, Theobromin, Eupaverin oder Chophytol zugeführt werden.

2. Soll die Cholesterinolyse durch Vermehrung der im Blute vorhandenen Fettsäuren bzw. Seifen verbessert werden, so muß die Cholesterinesterase gehemmt werden.

Darüber, wie bzw. mit welchem Erfolg dieser letztgenannte Weg beschritten werden kann, sollen weitere Untersuchungen Aufschluß geben.

Von diesen praktisch-therapeutischen Gesichtspunkten abgesehen, bestätigen die mitgeteilten Befunde das Ergebnis der experimentellen Arteriosklerosеforschung, „daß es sich bei der Ablagerung von Cholesterin und Kalk in der Gefäßwand nicht um eine Degeneration handeln kann, sondern daß eine Infiltration vorliegt“ (Schönholzer[4]), daß es sich also um kolloidchemische Prozesse handelt. So beachtenswert indessen die Forderung von Schönholzer[4] ist, daß bei der Therapie der Arteriosklerose die Kolloide der Gefäßwand vor Veränderungen bewahrt werden müssen, die zur Anlagerung von Fremdstoffen führen, so ist sie doch nach den vorstehend mitgeteilten Untersuchungen einerseits zu eng, da auch der kolloidchemische Zustand der im Blute gelösten Stoffe, besonders der Seifen und des Cholesterins, wichtig ist, andererseits anscheinend insofern abwegig, als weniger „die Neigung der Eiweißkolloide zu Adsorption“ als vielmehr die Menge und der physikochemische Zustand der Fettsäuren bzw. Seifen im Blute und Gewebe für die Löslichkeit des Cholesterins von ausschlaggebender Bedeutung sind.

Zusammenfassung.

1. Es wurde gefunden, daß die Fähigkeit des Organismus, Cholesterin in Lösung zu halten bzw. zu bringen, physikochemisch zu erklären ist. Die Cholesterinolyse hängt von der Anwesenheit und dem Lösungszustand von Fettsäuren bzw. Seifen ab.

2. Die Substanzen, die im Blute die Cholesterinolyse erhöhten, erniedrigten oder nicht beeinflußten, wirkten in den geschilderten Modellversuchen in der gleichen Weise.

3. Auf die praktisch-therapeutischen Gesichtspunkte dieser Befunde und ihre Bedeutung für die Erforschung der Arteriosklerose wird hingewiesen.

[4] Schönholzer, G.: Erg. inn. Med. **62**, 794 (1942).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Friedrich Schiller-Universität Jena
(Leiter: Prof. Dr. med. et phil. Labes).

Über die Wirkung des Hydrochinons und seiner Oxydationsprodukte auf den überlebenden Kaninchendarm.

Von
Dr. med. L. Ther und cand. med. E. Lüdde.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 11. März 1944.)

I. Einführung in das Thema und Problemstellung.

Labes[1] hat als erster am Carotisstreifen nach O. B. Meyer[2] den Nachweis erbracht, daß das Adrenalin nur in Sauerstoffgegenwart seine Wirkung entfaltet. Er konnte zeigen, daß der Gefäßmuskelstreifen, der in einer eigens konstruierten Apparatur sorgfältig von Sauerstoff befreit war, erst dann auf Adrenalin mit einer Kontraktion reagiert, wenn Sauerstoff in die Apparatur eingeleitet wird. Labes[1] nimmt dabei an, daß Oxydationsprodukte dieses Dioxyphenolderivates bei der Adrenalinwirkung eine wesentliche Rolle spielen. Da viele Dioxyphenole bei alkalischer Reaktion sich sehr viel leichter oxydieren als bei saurer Reaktion, hat Labes[1] die Frage der Wirksamkeit oxydationsfähiger Polyphenole auch an anderen Objekten geprüft. So konnte er am Zentrenpräparat des Blutegels nachweisen, daß eine mit Sauerstoff durchströmte, alkalische Hydrochinon lösung sehr viel giftiger wirkt als eine saure Hydrochinonlösung. Um auszuschließen, daß in den Versuchen von Labes[1] die alkalische Reaktion als solche, vielleicht durch stärkere Dissoziation des Hydrochinons, die stärkere Giftwirkung entfaltet, hat Bergstermann[3] die Versuche von Labes[1] unter Ausschluß von O_2 wiederholt und gefunden, daß bei Sauerstoffabwesenheit die saure und die alkalische Hydrochinonlösung am Blutegelzentrenpräparat keinen Wirkungsunterschied aufweisen.

Auf Grund dieser Versuchsergebnisse hat Labes[1] versucht, den Sauerstoffeffekt in der Weise zu deuten, daß Oxyphenole erst dann wirksam werden, wenn ihnen die Möglichkeit zur Bildung von Chinonen gegeben wird, welche den Wirkungseffekt durch Störung der Gewebsatmung hervorrufen. Bereits A. v. Szent-Györgyi[4] hat den Standpunkt vertreten, daß chinonbildende Dioxyphenole die Rolle eines Wasserstoffüberträgers übernehmen können, indem sie als Wasserstoffdonator zwei Wasserstoffatome direkt oder indirekt an Luftsauerstoff abgeben und sich dabei gleichzeitig in Chinone verwandeln. Diese Chinone sind wiederum fähig, als Wasserstoffakzeptor der Milchsäure den durch Fermente freigemachten Wasserstoff aufzunehmen, wobei sie sich gleichzeitig wieder in die Polyphenolform zurückbilden. Daß die Polyphenole tatsächlich den Stoffwechsel beeinflussen können, haben Untersuchungen von Evans[5]

ergeben, der eine starke Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs des Herzens durch Adrenalin nachweisen konnte. Auch die Befunde von Gremels[6], daß Adrenalin den Sauerstoffverbrauch des Herzens viel stärker anregt als Sympatol, kann nach Labes[1] darauf zurückgeführt werden, daß das Sympatol, das ja nur eine phenolische Hydroxylgruppe besitzt, erst durch Oxydation ein zweites Hydroxyl erhalten muß, um zum Chinonbildner zu werden. Daß auch Hydrochinon an geeigneten Objekten die O_2-Atmung um das Mehrfache steigern kann, hat Runnström[7] an Seeigeleiern nachgewiesen.

Aus den Versuchen von Labes[1] und Bergstermann[3] ergab sich für uns nun die Frage, ob die am Blutegel gewonnenen Befunde sich auch auf andere muskuläre Organe übertragen lassen. Die Frage der Wirkung des Hydrochinons und seiner Oxydationsprodukte auf die glatte Muskulatur des überlebenden, rhythmisch tätigen Dünndarms schien uns deshalb so interessant, weil sich nach Labes[1] möglicherweise die Abführwirkung der Anthrachinonderivate auf eine Wechselwirkung der Chinone mit den für die Gewebsatmung wichtigen Thiolgruppen zurückführen läßt.

Der Dünndarm schien uns auch deshalb als geeignetes Testobjekt, weil er zum Unterschied von anderen rhythmisch tätigen glattmuskeligen Organen eine weitaus größere Empfindlichkeit gegenüber Hydrochinon aufweist. In Vorversuchen haben wir uns davon überzeugt, daß Hydrochinonkonzentrationen, die am Kaninchenduodenum bereits zu einer irreversiblen Störung der Bewegungsleistungen führen, die rhythmische Tätigkeit des Meerschweinchenuterus kaum beeinflussen. Daß es möglich ist, auch bei Dickdarmmitteln in vitro am überlebenden Kaninchendünndarm eine peristaltikerregende Wirkung nachzuweisen, hat T. Okada[8] erstmalig gezeigt. T. Okada[8] ist es gelungen, die spezifische Dickdarmwirkung der Anthrachinonderivate lediglich auf die reduzierende Tätigkeit der Bakterienflora (Coli) zurückzuführen.

II. Über die Methodik und die Oxydierbarkeit von Hydrochinon in der verwendeten Tyrodelösung.

Die Untersuchung am überlebenden Dünndarm erfolgte auf übliche Weise nach der Methode von Magnus[9]. In einem Thermostaten*, dessen Temperatur durch Elektroregulierung auf 37° C konstant gehalten wurde, befand sich das zur Aufnahme des Darmstückes bestimmte Glasgefäß, welches 75 ccm Tyrodelösung folgender Zusammensetzung enthielt:

80 g NaCl,	20 ccm 10%ige $CaCl_2$-Lösung,
20 ccm 10%ige KCl-Lösung,	10 ccm 10%ige $MgCl_2$-Lösung

wurden in 9 Liter Aqua dest. gelöst und als Tyrode I bezeichnet.

10 g $NaHCO_3$,
10 ccm 5%ige NaH_2PO_4-Lösung

wurden in 1 Liter Aqua dest. gelöst und als Tyrode II bezeichnet. Vor dem Gebrauch wurden 9 Teile Tyrode I und 1 Teil Tyrode II miteinander gemischt.

Die Durchströmung der Tyrodelösung mit Sauerstoff erfolgte aus einem Sauerstoffgasometer. Der Sauerstoffstrom wurde so eingestellt, daß etwa 100 Blasen pro Minute durch die Nährlösung hindurchperlten. Bei Versuchen ohne Sauerstoff wurde durch die Flüssigkeit Stickstoff geleitet, welcher zur völligen Entfernung von Sauerstoff durch zwei hintereinandergeschaltete Waschflaschen geleitet wurde, die beide eine Pyrogallol-Kalilaugelösung enthielten. Diese alkalische Pyrogallollösung wurde durch

* Eine Abbildung der Apparatur findet sich bei H. Ventzke[10], Inaug.-Diss. Jena 1944.

Mischen aus 1 Volumen 25%iger Pyrogallollösung und 5 Volumen konzentrierter Kalilauge (3 Gewichtsteile KOH + 2 Gewichtsteile Wasser) hergestellt.

Die Übertragung der rhythmischen Darmbewegungen erfolgte mit Hilfe eines Aluminiumstirnschreibers, der die Bewegungsleistungen des Darmes in einem Verhältnis 1:6 auf die berußte Kymographiontrommel auftrug. Eine Belastung des Schreibhebels wurde nicht vorgenommen.

Als Präparat diente Kaninchenduodenum, welches den frisch getöteten Tieren entnommen und entweder sofort oder in manchen Fällen nach Aufbewahren in Tyrodelösung im Eisschrank bei 3—5° verwendet wurde. Zur Untersuchung wurde ein 5 cm langes Darmstück durch sorgfältiges Ausspülen mit Tyrodelösung vom Darminhalt befreit und beiderseitig unterbunden in die Apparatur eingespannt.

Die zur Herstellung der Lösungen verwandten Chemikalien stammen von den Firmen Merck und Schering.

Die hier beschriebene Tyrodelösung reagiert durch ihren Bicarbonatgehalt leicht alkalisch. Diese alkalische Reaktion begünstigt bei O_2-Gegenwart die Oxydation des hinzugefügten Hydrochinons. Gibt man nämlich zu 75 ccm Tyrodelösung, die bei 37° C dauernd mit Sauerstoff durchperlt wird, beispielsweise 1—2 ccm einer 0,5%igen Hydrochinonlösung hinzu, so bilden sich nach wenigen Minuten gelbbraune Oxydationsprodukte des Hydrochinons. Daß es sich hier um Oxydationsprodukte handelt, erkennt man daran, daß diese Gelbfärbung ausbleibt, wenn man statt Sauerstoff Stickstoff durch die Tyrodelösung perlen läßt, oder ein Reduktionsmittel, z. B. Natriumsulfit, zusetzt. Wenn man die Bildung der Oxydationsprodukte von Hydrochinon durch Sticktoffdurchströmung der Tyrodelösung verhindern will, so braucht man bei Anwesenheit des Kaninchendarms keine besondere Apparatur zur Absperrung des Luftsauerstoffs, weil die schleimigen Produkte des Kaninchendarms an der Oberfläche der Tyrodelösung einen dichten Schaum von Stickstoffblasen bilden, der den Sauerstoffzutritt unter diesen Bedingungen für das vorliegende Organ und das betreffende Dioxyphenol hinreichend absperrt. Während in der mit Sauerstoff durchströmten, von Natur aus leicht alkalischen Tyrodelösung Hydrochinonzusatz sehr schnell zur Bildung von gelbbraun gefärbten Hydrochinonoxydationsprodukten führt, läßt sich diese Bildung von Oxydationsprodukten auch durch leichte Ansäuerung unterdrücken. Es genügt z. B. die Zugabe von 5 ccm m/10-NaH_2PO_4-Lösung zu 75 ccm Tyrode, um die Gelbfärbung der Tyrodelösung durch Hydrochinonoxydationsprodukte zu verhindern. Besondere Erwähnung muß auch die Beobachtung finden, daß der Zusatz von Traubenzucker zur Tyrodelösung (eine Messerspitze auf 75 ccm Tyrode) sowohl die oxydative Verfärbung der Hydrochinon-Tyrodelösung verhindern als auch den Wirkungseffekt der Hydrochinonoxydationsprodukte unterdrücken kann. Wir haben deshalb niemals bei unseren Versuchen der Tyrodelösung Traubenzucker zugesetzt.

III. Mitteilung der Versuchsergebnisse.

A. Versuche mit Hydrochinon.

1. Die Wirkung des Hydrochinons auf das überlebende Kaninchenduodenum bei neutraler Reaktion und in Gegenwart von Sauerstoff (s. Abb. 1).

Das überlebende Kaninchenduodenum führt in der Versuchsanordnung nach Magnus[9] lebhafte rhythmische Bewegungen aus, die als Pendelbewegungen bezeichnet werden. Diese rhythmisch erfolgenden Kontraktionen und Erschlaffungen der Längsmuskulatur werden durch Zusatz von 1 ccm 0,5%iger Hydrochinonlösung auf 75 ccm Tyrode bei Sauerstoff-

gegenwart in folgender Weise gestört (Abb. 1). Schon einige Sekunden nach dem Zusatz hören die rhythmischen Kontraktionen der Längsmuskulatur auf. Betrachtet man während dieses Stillstandes der Pendelbewegungen das Darmstück, so sieht man, daß an Stelle der rhythmischen Bewegungen der Längsmuskulatur heftige Kontraktionen der Ringmuskulatur erfolgen. Diese Einschnürungen der Ringmuskulatur, die abwechselnd an verschiedenen Stellen des Darmes auftreten, kommen in unserer Versuchsanordnung deshalb nicht zum Ausdruck, weil bei dieser nur die Längenveränderungen der Längsmuskulatur verzeichnet werden. 1—2 Min. nach dem Zusatz der Hydrochinonlösung kommt es nochmals zu einem Anstieg des Tonus der Längsmuskulatur, und erst nach weiteren 3—5 Min. nach dem Zusatz der Hydrochinonlösung ist der Darm vollkommen erschlafft und bewegungslos.

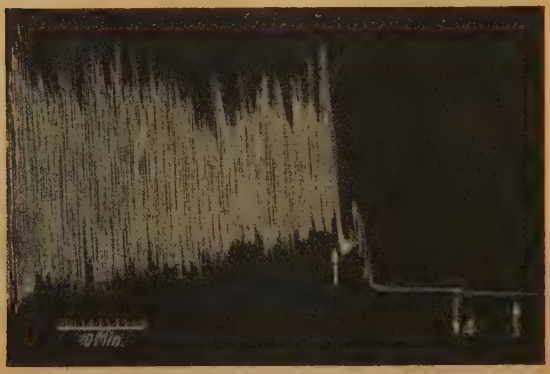


Abb. 1. Die Wirkung von Hydrochinon (1:15000) auf Kaninchenduodenum in 75 ccm Tyrode (Sauerstoffdurchströmung). 1. Pfeil: 1 ccm 0,5%iges Hydrochinon, bei *A* ausgewaschen; 2. Pfeil: 1 ccm 1%iges Bariumchlorid.

Die ursprünglich farblose Tyrodelösung hat sich während dieser Zeit zunächst schwach gelblich, dann stärker gelb und schließlich innerhalb 15 Min. braun gefärbt. Wird nach 20 Min. durch Wechsel der Tyrodelösung das Hydrochinon entfernt, so bleibt der Darm weiterhin erschlafft. Auch der Zusatz von 1 ccm 1%iger Bariumchloridlösung ruft keine Kontraktion hervor, so daß angenommen werden muß, daß die Hydrochinonkonzentration 1:15000 innerhalb von 20 Min. Einwirkungszeit eine irreversible Störung der glatten Muskulatur des Kaninchenduodenums hervorruft.

In mehreren Versuchen wurde von uns zunächst festgestellt, daß bei neutraler Reaktion geringere Konzentrationen von Hydrochinon als 1:15000 mitunter ohne Effekt auf den überlebenden Darm waren. Es wurde daher in den folgenden Versuchen diese Konzentration verwendet und festgestellt, daß eine Hydrochinonkonzentration 1:15000, die bei Sauerstoffgegenwart bereits nach 10 Min. Einwirkungszeit durch Wechseln der Tyrodelösung entfernt wurde, den Darm schon so schwer geschädigt hat, daß auch nach Auswaschen keine rhythmische Tätigkeit des Darmes spontan auftritt. Nach 10 Min. Einwirkungszeit läßt sich jedoch mit Bariumchlorid (1 ccm 1%iges Bariumchlorid auf 75 ccm Tyrode) meist eine, wenn auch sehr schwache, rhythmische Tätigkeit erzielen.

2. Die Wirkung des Hydrochinons auf das überlebende Kaninchenduodenum bei saurer und alkalischer Reaktion und in Gegenwart von Sauerstoff (Abb. 2).

Im folgenden Versuch haben wir die Wasserstoffionenkonzentration der Tyrodelösung durch Zusatz von 5 ccm m/10 NaH_2PO_4 zu 75 ccm Tyrode ins saure Gebiet verschoben. Diese Änderung der Wasserstoffionenkonzentration bleibt, wie wir aus Abb. 2 ersehen, ohne Einfluß auf die rhythmischen Bewegungsleistungen des überlebenden Dünndarms. Werden jedoch nach 5 Min. Einwirkungszeit des sauren Phosphats 2 ccm 0,5%iges Hydrochinon zugesetzt, so bleibt diese Konzentration, die doppelt so stark gewählt wurde als eine Hydrochinonkonzentration, die bei normaler

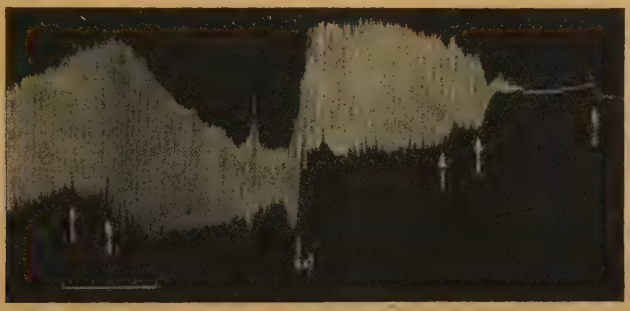


Abb. 2. Die Wirkung von Hydrochinon auf Kaninchenduodenum in 75 ccm Tyrode bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration (Sauerstoffdurchströmung). 1. Pfeil: 5 ccm m/10 NaH_2PO_4 (Ansäuern); 2. Pfeil: 2 ccm 0,5%iges Hydrochinon, *A* Wechsel der Tyrodelösung; 3. Pfeil: 1 ccm 2,5%iges Na_2CO_3 (Alkalisieren); 4. Pfeil: 0,5 ccm 0,5%iges Hydrochinon; 5. Pfeil: 1 ccm 1%iges Bariumchlorid. Zeitmarkierung 10 Min.

Reaktion eine sicher lähmende Wirkung entfaltet, auch nach 30 Min. ohne Wirkung auf die glatte Muskulatur. Es tritt aber auch während dieser Zeit keine Gelbverfärbung der Tyrodelösung ein. Werden durch Wechseln der Tyrodelösung das Hydrochinon und das NaH_2PO_4 entfernt und wird die Nährlösung durch Zusatz von 1 ccm 2,5%iger Na_2CO_3-Lösung alkalisch gemacht, so bleibt zunächst auch die Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration ins Alkalische ohne Einfluß auf den Rhythmus der Längsmuskulatur. Werden jedoch zur alkalischen Tyrodelösung 0,5 ccm einer 0,5%igen Hydrochinonlösung zupipettiert, so führt diese Konzentration, die halb so stark gewählt wurde als eine Hydrochinonkonzentration, die bei neutraler Reaktion eine sicher lähmende Wirkung entfaltet, innerhalb weniger Minuten zu einer vollkommenen Lähmung der glatten Muskulatur des Kaninchenduodenums.

Um auszuschließen, daß im vorliegenden Versuch alkalische Reaktion als solche, vielleicht durch stärkere Dissoziation des Hydrochinons, die stärkere Giftwirkung entfaltet, wurden weitere Versuche über die Wirkung von Hydrochinon bei Sauerstoffabwesenheit durchgeführt.

3. Die Wirkung des Hydrochinons auf das überlebende Kaninchenduodenum bei Sauerstoffabwesenheit.

Um die Oxydation von Hydrochinon zu verhindern, haben sich bei unseren Versuchen die bereits im Abschnitt II angegebenen Verfahren bewährt. In einer Reihe von Versuchen durchströmten wir die Tyrodelösung mit sauerstofffreiem Stickstoff; bei einem anderen Teil der Versuche verhinderten wir die Hydrochinonoxydation durch Zusatz von 1 ccm einer 2,5%igen Natriumsulfitlösung zu 75 ccm Tyrode. Während jedoch ein vorübergehender Sauerstoffentzug die rhythmische Tätigkeit eines Blutegelzentrenpräparates nur unwesentlich beeinflußt, so wird die rhythmische Tätigkeit eines Warmblüterorgans durch länger andauernden

Abb. 3. Die Wirkung von Hydrochinon auf Kaninchenduodenum in 75 ccm Tyrode (Stickstoffdurchströmung). 1. Pfeil: 1 ccm 0,5%iges Hydrochinon; 2. Pfeil: Auswaschen, Stickstoff abgestellt, Sauerstoff eingeleitet; 3. Pfeil: 1 ccm 1%iges Bariumchlorid.

Sauerstoffentzug empfindlich gestört. So werden die Pendelbewegungen des Kaninchenduodenums immer kleiner und hören schließlich nach halbstündigem bis einstündigem Sauerstoffentzug vollständig auf. Der Tonus der Längsmuskulatur nimmt dabei ab. Diese Erstickung läßt sich aber durch Auswaschen der Tyrodelösung und Zuleitung von Sauerstoff wieder beheben, vor allem dann, wenn der Sauerstoffentzug nicht allzu lange Zeit auf das Präparat schädigend eingewirkt hat.

a) Hydrochinonwirkung bei Stickstoffdurchströmung (s. Abb. 3). Läßt man anstatt Sauerstoff Stickstoff durch die Tyrodelösung strömen, so nehmen die Ausschläge des Schreibhebels allmählich ab. Setzt man 1 ccm 0,5%ige Hydrochinonlösung zu 75 ccm Tyrode hinzu und läßt diese über eine halbe Stunde auf das Präparat einwirken, so ändert sich das bekannte Bild der durch O_2-Entzug hervorgerufenen Erstickung des Darmes nicht. Wechselt man nach einer halben Stunde die hydrochinonhaltige Tyrodelösung, so bemerkt man, daß diese farblos geblieben ist, also keine Oxydation erfolgt ist. Leitet man in die frische Tyrodelösung Sauerstoff ein, so beginnt meist spontan die rhythmische

Pendeltätigkeit, die sich durch Zusatz von 1 ccm einer 1%igen Bariumchloridlösung unter Tonuszunahme deutlich verstärken läßt.

b) Versuch mit Natriumsulfitzusatz (Abb. 4). Setzt man zu einem in 75 ccm Tyrode befindlichen Darmstück 1 ccm einer 2,5%igen Natriumsulfitlösung hinzu, so tritt meist eine nur kurz andauernde Erregung ein. Werden kurze Zeit nach dem Sulfitzusatz 2 ccm einer 0,5%igen Hydrochinonlösung hinzugefügt, so bleibt diese ohne Wirkungseffekt, auch wenn

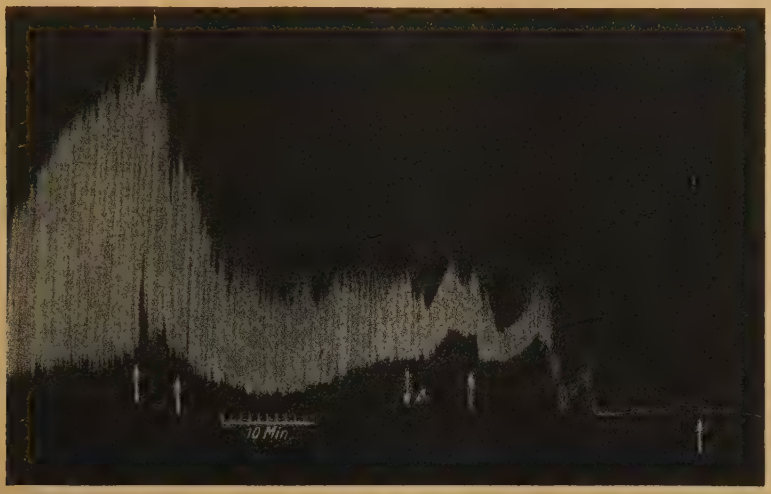


Abb. 4. Die Wirkung von Hydrochinon auf Kaninchenduodenum in 75 ccm Tyrode bei Gegenwart oxydationshemmender Stoffe. 1. Pfeil: 1 ccm 2,5%iges Natriumsulfit; 2. Pfeil: 2 ccm 0,5%iges Hydrochinon, A Wechsel der Tyrodelösung; 3. Pfeil: 0,5 ccm 0,5%iges Hydrochinon; 4. Pfeil: 1 ccm 1%iges Bariumchlorid. Zeitmarkierung 10 Min.

man das Hydrochinon länger als eine halbe Stunde auf das Präparat einwirken läßt. Setzt man jedoch nach Auswaschen der hydrochinon- und natriumsulfithaltigen Tyrodelösung nur 0,5 ccm einer 0,5%igen Hydrochinonlösung hinzu, also den vierten Teil der obengenannten Dosis, so tritt meist schon bei dieser Hydrochinonkonzentration unter Braunfärbung der Tyrodelösung innerhalb weniger Minuten eine irreversible Störung der glatten Muskulatur des Kaninchenduodenums ein.

Um auszuschließen, daß im Versuch mit Natriumsulfit vielleicht eine spezifische Sulfitwirkung als solche den Hydrochinoneffekt beeinflußt, wurden auch einige Versuche mit Ascorbinsäure als Reduktionsmittel durchgeführt. Es zeigte sich, daß auch Ascorbinsäure die Hydrochinonoxydation und den damit verbundenen Wirkungseffekt zu verhindern vermochte.

Aus den beiden geschilderten Versuchen geht hervor, daß das Hydrochinon niemals seine deletäre Wirkung entfaltet, wenn seine Oxydation verhindert wird. Die besonders starke Giftigkeit des Hydrochinons bei

alkalischer Reaktion kann daher ohne weiteres auf die bei dieser Reaktion besonders begünstigte Oxydation zurückgeführt werden. Es ergibt sich nun die Frage, welche Oxydationsprodukte des Hydrochinons es sind, die eine irreversible Schädigung der Muskulatur des Kaninchenduodenums hervorrufen. In weiteren Untersuchungen wurden daher Chinon und andere Oxydationsprodukte des Hydrochinons geprüft.

B. Versuche mit Oxydationsprodukten des Hydrochinons.

1. Die Wirkung des Chinons auf das überlebende Kaninchenduodenum (s. Abb. 5).

Zu den folgenden Versuchen verwandten wir zunächst eine Chinonkonzentration 1:15000 (= 1 ccm einer 0,5%igen Chinonlösung auf 75 ccm Tyrode), die in gleicher Weise wie eine Hydrochinonlösung von gleicher Konzentration reagiert. Dabei scheint es bemerkenswert zu sein, daß auch beim Chinon der Wirkungseffekt nicht momentan, sondern erst einige Minuten (1—3 Min.) nach dem Zusatz der Chinonlösung eintritt. Der Wirkungseffekt des Chinons am überlebenden Kaninchenduodenum in einer Konzentration 1:15000 ist folgender: Es tritt ein Stillstand der Pendelbewegungen ein; die Längsmuskulatur ist aber dabei nicht immer erschlafft, in manchen Fällen kommt es zunächst zu einem Stillstand in mittlerer Tonuslage. Betrachtet man während dieses Stillstandes das Darmstück, so sieht man heftige Kontraktionen der Ringmuskulatur, die einige Minuten anhalten. Innerhalb von einigen weiteren Minuten gehen sowohl Längs- als auch Ringmuskulaturerregung in Erschlaffung über. Wird das Chinon innerhalb von 10 Min. durch Wechsel der Tyrodelösung entfernt, so läßt sich mit Bariumchlorid nachweisen, daß noch keine irreversible Lähmung eingetreten ist. Längere Einwirkungszeit des Chinons führt zu einer irreversiblen Schädigung der Darmmuskulatur.

Zunächst hatten wir nun erwartet, daß eine Chinonkonzentration 1:15000 sofort zu dem für Hydrochinonoxydationsprodukte charakteristischen Vergiftungsbild führen würde, weil das Chinon ja bereits als oxydiertes Produkt vorliegt und somit keine Zeit notwendigerweise verstreichen muß, bis die Oxydation des Hydrochinons zum Chinon durchgeführt ist. Wenn daher trotzdem ein bestimmtes Zeitintervall bis zum Eintritt der Wirkung erforderlich ist, so ist diese Erscheinung nach Bergstermann[3] wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß das Chinon wegen seiner gerbenden Eigenschaften nur sehr langsam in das Präparat eindringt, während das Hydrochinon zunächst leicht in das Präparat eindringt, dort aber erst oxydiert werden muß, um seine deletäre Wirkung zu entfalten. Der bereits erwähnte, allmählich eintretende Stillstand der Pendelbewegungen in mittlerer Tonuslage war besonders gut nach dem Zusatz geringer Hydrochinonkonzentrationen (1:150000) bei alkalischer

Reaktion und bei geringen Chinonkonzentrationen (1:150000) sowohl im alkalischen als auch im neutralen Milieu zu beobachten und könnte ebenfalls auf Wechselbeziehungen zwischen Hydrochinon-Oxydationsprodukten und Eiweiß zurückgeführt werden. Aus Abb. 5 kann man ersehen, daß nach Zugabe der Chinonlösung sowohl die Erschlaffung als auch die Kontraktion der Längsmuskulatur des Kaninchenduodenums geringer wird, so daß das Präparat sich allmählich auf eine mittlere Tonuslage einstellt. Man könnte daher annehmen, daß die kontraktilen Zellsubstanzen durch Oxydationsprodukte des Hydrochinons zunächst betroffen werden und in

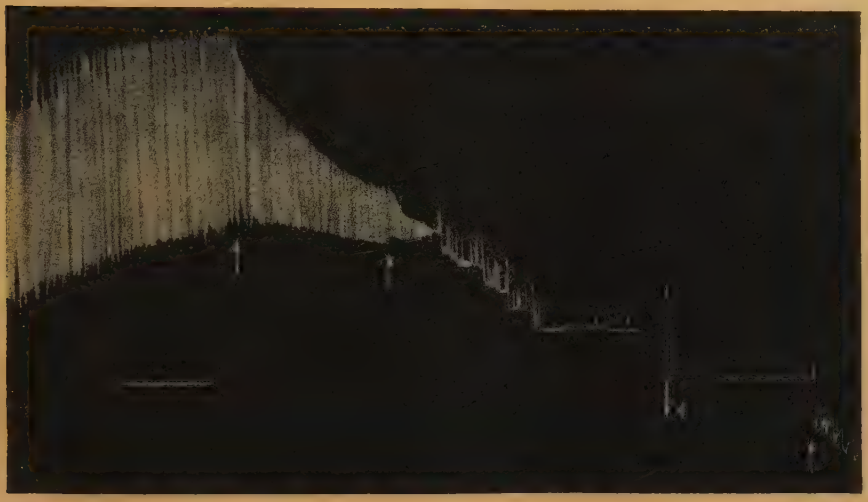


Abb. 5. Die Wirkung von Chinon auf Kaninchenduodenum in 75 ccm Tyrode (Sauerstoffdurchströmung). 1. und 2. Pfeil: Je 1 ccm 0,1%ige Chinonlösung, *A* Wechsel der Tyrodelösung; 3. Pfeil: 1 ccm 1%iges Bariumchlorid. Zeitmarkierung 10 Min.

der Ausübung ihrer rhythmischen Funktion (Kontraktion—Erschlaffung) eine Hemmung erfahren.

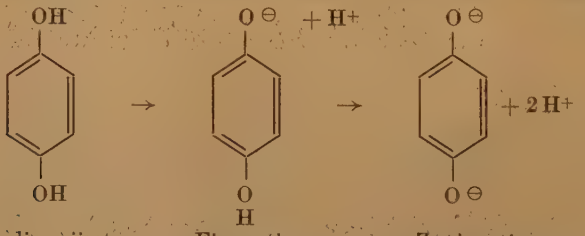
Diese Erklärung ist aber deshalb nicht ganz befriedigend, weil der Stillstand der Pendelbewegungen in mittlerer Tonuslage nicht bestehen bleibt, sondern nach weiteren Minuten in eine Erschlaffung der Längsmuskulatur bei gleichzeitiger stärkster Erregung der Ringmuskulatur übergeht. Es mußte aber auch daran gedacht werden, daß das Chinon ebenfalls erst eine chemische Umwandlung erfahren könnte, die es in eine wirksamere Form überführt. Schon BERGSTERMANN[3] war am Blutegelzentrenpräparat aufgefallen, daß eine alkalische Hydrochinonlösung in Sauerstoffgegenwart mitunter eine etwas stärkere Wirkung als eine äquimolare Chinonlösung entfalten kann. Diese Wirkungsdifferenz hat BERGSTERMANN[3] mit dem Hinweis zu deuten versucht, daß die Oxydation des Hydrochinons zu Chinon über besonders wirksame, radikalartige Stufen

erfolgt. Auch von Labes[1] wurde bereits beobachtet, daß beim Einpipettieren von Hydrochinon in eine alkalische Ringer-Lösung, in welcher sich ein Blutegelpräparat befand, zunächst eine grüngelbe Färbung auftritt, die nach kräftiger Vermischung wieder weitgehend abblaßt. Diese Beobachtung ließ vermuten, daß vom Blutegelpräparat Wasserstoffdonatoren in die Lösung diffundieren, die das vom Sauerstoff des Wassers oxydierte Hydrochinon wieder reduzieren. Ausführliche Untersuchungen von Bergstermann[3] haben diese von Labes[1] aufgestellte Vermutung bestätigt. Er konnte nachweisen, daß durch die Anwesenheit des Blutegels ein Teil des in einer Nährlösung vorhandenen Chinons wiederum zu Hydrochinon reduziert wird. Dabei besteht die Möglichkeit, daß die Reduktion über *wirksame, radikalartige Zwischenstufen* erfolgt. Am überlebenden Kaninchenduodenum konnte von uns keine Überlegenheit einer alkalischen Hydrochinonkonzentration gegenüber einer äquimolaren Chinonkonzentration festgestellt werden. Bei diesen vergleichenden Untersuchungen wurde jedoch stets beobachtet, daß auch eine alkalische Chinonlösung rasch eine gelbbraune Farbe annimmt, während sie sich innerhalb der gleichen Zeit bei neutraler Reaktion nur schwach gelb verfärbt. Bevor wir jedoch die Wirkung von undefinierten, braun gefärbten Oxydationsprodukten auf das Kaninchenduodenum beschreiben, wollen wir kurz auf die in der chemischen Literatur bekannten Beziehungen von Farbe und chemischer Konstitution der Oxydationsprodukte des Hydrochinons eingehen.

Bei der Oxydation von Hydrochinon entstehen: Chinon, Oxychinon, Dioxychinon und schließlich Huminsäuren, die aus polymerisiertem Oxychinon bestehen. Über die Farben von Hydrochinon und seinen Oxydationsprodukten liegen zahlreiche Angaben vor. H. Staude[11] konnte in Übereinstimmung mit Leubner[12] folgende Aufstellung machen:

Hydrochinon	farblos	Hydrochinonation*	farblos
Chinon	gelb	Chinonation	gelb
Oxychinon	dunkelrot	Oxychinonation	grün
Dioxychinon (fast nur in Alkali löslich)	rotbraun	Dioxychinonation	rotbraun.

Das Hydrochinon ist eine zweibasische Säure, die je nach der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung mehr oder minder stark dissoziiert ist, und zwar können ein- und zweiwertige Ionen des Hydrochinons in der Lösung vorhanden sein.



Undissoziiert. Einwertiges Hydrochinonation. Zweiwertiges Hydrochinonation.

* Über die Dissoziationsstufe liegen keine Angaben vor. Wahrscheinlich ist das einwertige Ion des Hydrochinons gemeint.

Die Dissoziationskonstanten des Hydrochinons betragen nach Angabe von MICHAELIS[13]:

$$K_1 = 1 \cdot 10^{-10},$$
$$K_2 = 3 \cdot 10^{-12}.$$

Nach einer aus dem Massenwirkungsgesetz abgeleiteten Formel beträgt

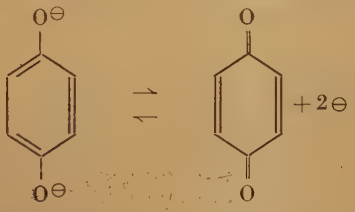
$$[H^+] = K_s \frac{[Sh]}{[S^-]};$$

daraus ergibt sich:

$$[H^+] : K_s = [Sh] : [S^-].$$

Setzen wir für [Sh] die Konzentration des undissoziierten Hydrochinons, für [S⁻] den Anteil des dissoziierten Hydrochinons, so ergibt sich bei einer Wasserstoffionenkonzentration $[H^+] = 1 \cdot 10^{-7}$, welche unserer Tyrodelösung nahekommt, daß nur ein Bruchteil der zupipettierten Hydrochinonmoleküle, und zwar ungefähr $^1/_{1000}$ in erster Dissoziationsstufe und $^1/_{100000}$ in zweiter Dissoziationsstufe vorhanden sind. Versetzt man dagegen eine wäßrige Hydrochinonlösung mit soviel Natronlauge, daß ihre Wasserstoffionenkonzentration einen Wert $[H^+] = 1 \cdot 10^{-12}$ erreicht, so werden, da das Verhältnis [Sh] : [S⁻] = 1 : 1 beträgt, 50% der zugesetzten Hydrochinonmoleküle in der zweiten Dissoziationsstufe vorliegen.

Betrachtet man die Konstitutionsformel eines zweiwertigen Hydrochinonations, so sieht man, daß eine enge Beziehung zum Chinon besteht, indem es durch Abgabe von zwei Elektronen ⊖, also Oxydation, in Chinon übergehen kann. Umgekehrt kann sich das Chinon durch Aufnahme von zwei Elektronen, die es dem elementaren Wasserstoff entreißt, in Hydrochinonation verwandeln. Die elektronenspendenden Wasserstoffatome werden dadurch zu Wasserstoffionen. Dieser Prozeß stellt die Reduktion des Chinons durch Wasserstoff oder Wasserstoffdonatoren dar.



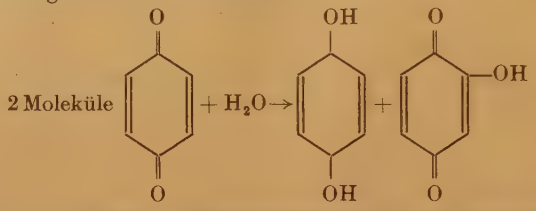
Zweiwertiges Ion des Hydrochinons, benzoide Form. **Chinon, chinoide Form.**

Nehmen wir diesen Verlauf der Reaktion an, so müssen wir das zweiwertige Hydrochinonion als eine reduzierte Stufe und das Chinon als die dazugehörige oxydierte Stufe betrachten (MICHAELIS[13]). Bei aromatischen Substanzen nehmen die Doppelbindungen eine chinoide Form an.

Die gelbe Farbe einer stark alkalischen Hydrochinonlösung kann nach H. STAUDE[11], da Hydrochinon farblos ist, zwei Ursachen haben: Gehalt an Chinon und Chinonat. Daß in konzentrierten alkalischen, sauerstoffhaltigen Hydrochinonlösungen Chinon vorhanden ist, erkennt man bereits am Geruch und ferner daran, daß es sich durch Schütteln mit organischen Lösungsmitteln, z. B. mit Xylol, entfernen läßt. In verdünnten, stark alkalischen, sauerstoffhaltigen Hydrochinonlösungen, die auch stark gefärbt sind, ist kein bzw. nur sehr wenig undissoziiertes Chinon vorhanden, wie H. STAUDE[11] durch Ausschüttelversuche feststellen konnte. Das Chinon liegt eben

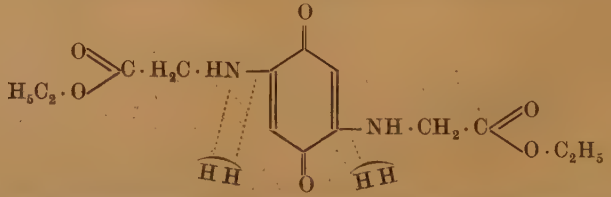
in stark alkalischer, verdünnter Lösung nach H. Staude[11] in ionisierter oder in einer anderen schwer ausschüttelbaren Form vor. Säuert man derartige Lösungen an, so geht die intensive Farbe zurück, und es läßt sich mit Lipoidlösungsmitteln wiederum Chinon ausschütteln. Nach H. Staude[11] ist dieser Versuch ein Beweis dafür, daß das Chinonat, welches durch Ansäuern in undissoziiertes Chinon übergeführt wird, gelb gefärbt ist. Die gelbe Farbe der nicht angesäuerten Lösung geht bald in braun über.

Bei der Oxydation von Hydrochinon wird häufig auch eine grüne Farbe beobachtet. Nach Leubner[12] ist es die Farbe des Oxychinonations. Wie Versuche von H. Staude[11] ergaben, entsteht die grüne Farbe auch dann, wenn man Chinon mit Alkali unter Luftabschluß versetzt. Es kann sich also um eine Disproportionierung des Chinonats handeln, wobei Oxychinon und Hydrochinon bzw. die entsprechenden Ionen nach folgender Formel entstehen:



Durch Ansäuern der grünen Oxychinonatlösung erhält man eine tiefrote Farbe, die vom Oxychinon herrührt. Beim Stehen an der Luft geht die grüne Farbe in braun über und schließlich scheidet sich ein braunes, flockiges Produkt ab. Da man deutlich wahrnehmen kann, wie auch die weitere Verfärbung von der Oberfläche her vor sich geht, also doch wohl unter Mitwirkung von Sauerstoff, so dürfte es sich hier um einen Oxydationsvorgang handeln bzw. auch um eine Kondensation, denn die Endprodukte dieser Umsetzung sind die Huminsäuren.

Erwähnenswert scheint uns auch noch zu sein, daß die Oxydationsprodukte des Hydrochinons das Darmstück rotbraun färben. Dabei ergibt sich nun die Frage, ob diese Rotbraunfärbung auf eine Wechselbeziehung zwischen Hydrochinonoxydationsprodukten und Eiweiß zurückgeführt werden könnte. In diesem Zusammenhang soll auf die Rotfärbung eines Caseinnährbodens durch Hydrochinon hingewiesen werden. Da Iványovics[14] zeigen konnte, daß die Rotfärbung des Caseinnährbodens durch Cystein verhindert werden kann, so sind an der Reaktion sicherlich Oxydationsprodukte des Hydrochinons beteiligt. Nach Cooper[15] kommt die Verfärbung dadurch zustande, daß die Chinone mit den Aminosäuren eine farbige Verbindung ergeben. E. Fischer und Schrader[10] haben festgestellt, daß die Chinone mit Aminosäuren keine Schiffschen Basen bilden, sondern daß bei der Reaktion 2 Moleküle Aminosäureester an die Stelle der aromatisch gebundenen Wasserstoffe treten.



Durch die vier freigewordenen H-Atome werden andere Moleküle des Chinons zu Hydrochinon reduziert.

Demnach verwandelt sich das Hydrochinon in eine reversible, oxydierbare und reduzierbare Verbindung von chinoidartigem Bau, die über ein

sehr hohes Redoxpotential verfügt. Das Redoxpotential des p-Chinon-Hydrochinonsystems beträgt bei neutraler Reaktion + 0,271 Volt, also bedeutend mehr als das Potential der meisten Redoxsysteme. Das Chinon-Hydrochinonsystem hat dementsprechend ein viel stärkeres Oxydationsvermögen, d. h. stärkere Wasserstoffakzeptoreigenschaften, als die meisten Lebensfunktionen der Zelle vertragen können. Durch das Chinon-Hydrochinonsystem werden andere lebenswichtige Redoxsysteme in der Zelle oxydiert und ihr für die Erhaltung der Lebensfunktion wichtiger Gleichgewichtszustand vollkommen umgestoßen.

2. Die Wirkung von undefinierten braungefärbten Oxydationsprodukten des Hydrochinons auf das Kaninchenduodenum (Abb. 6).

Die folgenden Versuche haben uns gezeigt, daß auch dann die Oxydationsprodukte des Hydrochinons einen Wirkungseffekt hervorrufen, wenn sie eine braune Farbe angenommen haben. Wir haben uns zu diesem Zweck eine Chinhydronlösung hergestellt, indem wir 0,1 g Chinhydron in einem offenen Becherglas mit 300 ccm destilliertem Wasser versetzten und bei Zimmertemperatur unter mehrmaligem Schütteln einige Tage stehen ließen. Innerhalb der ersten 24 Stunden lösen sich etwa die Hälfte der Chinhydronkristalle in destilliertem Wasser auf, wobei sich die überstehende Flüssigkeit schwach rötlich-braun färbt. Nach 48 Stunden ist die Menge der Chinhydronkristalle bis auf einzelne Kriställchen gelöst und die überstehende Flüssigkeit ist lachsfarben. Nach 72 Stunden sind alle Kristalle gelöst, die Flüssigkeit ist braunrot gefärbt und zeigt nach weiteren 24 Stunden eine braune Farbe. Während der weiteren Tage bleibt die Lösung klar und braun gefärbt. Uns interessierte nun die Frage, ob sich in dieser braun gefärbten Chinhydronlösung mit Hilfe eines Lipoidlösungsmittels Chinon (undissoziiert) ausschütteln läßt. Wir haben daher 20 ccm der 8 Tage alten Chinhydronlösung abpipettiert und in einem Schüttelzylinder mit 10 ccm Benzol kräftig geschüttelt. Bei diesem Versuch blieb das Benzol, welches sich nach längerem Stehen über der braunen, wäßrigen Phase sammelte, klar und farblos *.

* Über die Löslichkeit von Hydrochinon, Chinon und Chinhydron sei noch folgendes bemerkt: Werden gleiche Teile einer wäßrigen, schwach gelb gefärbten, 0,05%igen Chinonlösung und eine wäßrige, farblose, 0,05%ige Hydrochinonlösung miteinander vermischt, so nimmt die gelbe Farbe der Chinonlösung entsprechend der Verdünnung durch die farblose Hydrochinonlösung ab. Läßt man dieses Gemisch längere Zeit in einem offenen Becherglas stehen, so nimmt es zunächst einen roten und später einen braunen Farbton an. Werden dagegen konzentrierte Lösungen von Chinon und Hydrochinon miteinander vermischt, z. B. gleiche Teile einer 0,5%igen Chinonlösung mit einer 0,5%igen Hydrochinonlösung, so entsteht im Augenblick des Zusammenbringens der Lösungen eine gelbbraune Verfärbung, aus welcher sich im Laufe weniger Minuten Kristalle (Chinhydron) abscheiden. Die über den Kristallen stehende Flüssigkeit ist gelbbraun. Werden 20 ccm dieser gelbbraunen Flüssigkeit abpipettiert, filtriert

Werden 1—2 ccm dieser 8—10 Tage alten braunen Chinhydronlösung zu dem in 75 ccm Tyrode befindlichen Darmstück hinzupipettiert, so tritt sehr bald das für die Chinonvergiftung typische Erscheinungsbild auf. Die Pendelbewegungen werden immer kleiner und die Darmmuskulatur kommt allmählich, meist in einer mittleren Tonuslage, zum Stillstand (Abb. 6). Auch hier kann man wiederum, wenn man während dieses Stillstandes das Darmstück betrachtet, heftige Kontraktionen der Ringmuskulatur beobachten. Wird nach halbstündiger Einwirkungszeit die Chinhydronlösung durch Auswaschen mit Tyrodelösung beseitigt, so läßt sich mit Barium eine heftige Kontraktion der Ringmuskulatur hervorrufen.

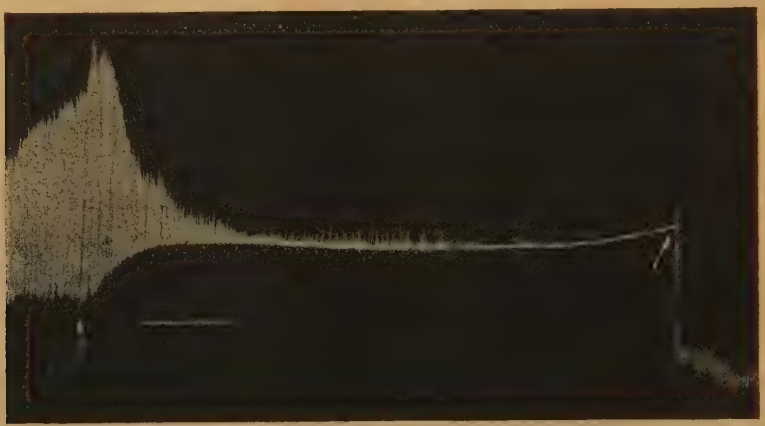


Abb. 6. Die Wirkung einer 10 Tage alten braunen Chinhydronlösung auf Kaninchenduodenum in 75 ccm Tyrode. 1. Pfeil: 2 ccm Chinhydron (0,1:300 — 10 Tage alt); 2. Pfeil: 1 ccm 1%ige Bariumchloridlösung; Zeitmarkierung 10 Min.

Vergleichende Untersuchungen haben ergeben, daß weder das Hydrochinon noch das Chinon in gleicher Konzentration und innerhalb der gleichen Zeit bei neutraler Reaktion diesen Wirkungseffekt hervorrufen. Da wir aber stets beobachtet haben, daß sich das Chinon in der Tyrodelösung verfärbt, so hat sich uns die Frage aufgedrängt, ob nicht auch das Chinon, um die beschriebene Wirkung hervorzurufen, erst in eine braune Oxydationsstufe übergehen muß. Wir haben daher in weiteren Versuchsreihen das Chinon auch in Anwesenheit von Sulfit geprüft und gefunden, daß bei Sulfitgegenwart die typische Wirkung des Chinons ausbleibt. Wie Abb. 7 zeigt, rufen 2 ccm einer 0,1%igen Chinonlösung, die zu 75 ccm sulfithaltiger Tyrode hinzupipettiert wurden, keinen typischen Chinoneffekt hervor. Im Gegenteil, der zweite Kubikzentimeter der 0,1%igen

und in einem Schüttelzylinder mit 10 ccm Benzol kräftig geschüttelt, so färbt sich das Benzol intensiv gelb und die ursprünglich braune Farbe der wäßrigen Phase verblaßt beinahe bis zur Farblosigkeit. Die Chinhydronkristalle sind in Benzol praktisch unlöslich.

Chinonlösung bewirkt eine Verstärkung der Pendelbewegungen. Wird die Chinonlösung nach einstündiger Einwirkungszeit durch Auswaschen mit Tyrode entfernt, so erweist sie sich als vollkommen farblos, da sie wahrscheinlich durch das Sulfit in das unwirksame Hydrochinon reduziert wurde. Daß diese Entfärbung auf eine Reaktion des Chinons mit Sulfit allein zurückzuführen ist, haben entsprechende Versuche ohne Darmstück ergeben. Wegen dieser Wechselbeziehungen Chinon—Sulfit * bietet dieser Versuch leider kein eindeutiges Ergebnis. Nur soviel läßt sich vielleicht daraus ableiten, daß bei der sehr rasch vor sich gehenden Reduktion des Chinons durch Natriumsulfit *keine Zwischenstufen* auftreten, die eine besondere Wirksamkeit auf das Kaninchenduodenum entfalten.

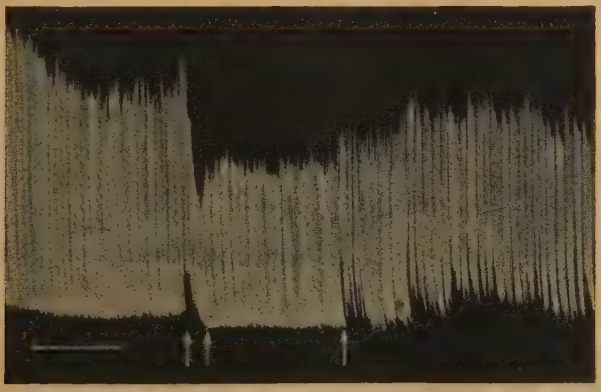


Abb. 7. Die Wirkung von Chinon auf Kaninchenduodenum in 75 ccm Tyrode bei Sulfitgegenwart. 1. Pfeil: 1 ccm 2,5%iges Natriumsulfit; 2. und 3. Pfeil: Je 1 ccm 0,1%ige Chinonlösung. Zeitmarkierung 10 Min.

Zusammenfassung.

Den Untersuchungen von LABES verdanken wir die Erkenntnis, daß Adrenalin und auch andere Polyphenole nur in Gegenwart von Sauerstoff ihre Wirksamkeit entfalten. In der vorliegenden Arbeit wurde am überlebenden Kaninchenduodenum in Tyrodescher Lösung in einer Versuchsanordnung nach MAGNUS die Wirkung des Hydrochinons und seiner Oxydationsprodukte geprüft.

1. Das *Hydrochinon* bewirkt in Sauerstoffgegenwart in einer Konzentration 1:15000 innerhalb weniger Minuten einen Stillstand der Pendelbewegungen. Nach Erschlaffung der Längsmuskulatur kommt es zunächst zu einer kurz andauernden Erregung der Ringmuskulatur und im weiteren

* Man könnte dabei auch an eine Additionsverbindung von Sulfit an die Chinonkarbonylsauerstoffe denken, etwa analog der Wechselwirkung von schwefliger Säure mit Aldehyden.

Verlauf von einigen Minuten zu einer vollkommenen Erschlaffung und irreversiblen Schädigung des Darmstückes. Die Wirkung des Hydrochinons ist abhängig von der Konzentration und der Einwirkungszeit. Wird durch Sauerstoffentzug, z. B. durch Stickstoffdurchleitung durch die Tyrodelösung oder durch Anwesenheit von Reduktionsmitteln (Zusatz von Natriumsulfit zur Tyrodelösung), die Oxydation des Hydrochinons verhindert, so bleibt auch eine Hydrochinonkonzentration 1:7500 wirkungslos. Von besonderer Bedeutung für das Zustandekommen der Hydrochinonwirkung, auch in Sauerstoffgegenwart, ist die Wasserstoffionenkonzentration der Tyrodelösung. Wird die Tyrodelösung angesäuert, so bleiben hohe Hydrochinonkonzentrationen wirkungslos, weil den Hydrochinonmolekülen die Möglichkeit zur Oxydation erschwert wird. Umgekehrt entfalten schon geringe Hydrochinonlösungen eine deletäre Wirkung, wenn man die Tyrodelösung durch Zusatz von Natriumkarbonat leicht alkalisch macht.

2. Versuche mit frisch bereiteten, wäßrigen *Chinonlösungen* haben ergeben, daß auch das Chinon niemals sofort im Augenblick der Zugabe zur Tyrodelösung, sondern immer erst nach einigen Minuten seine schädigende Wirkung entfaltet. Die Chinonwirkung ist charakterisiert durch einen Stillstand der Pendelbewegungen in mittlerer Tonuslage, welche nach kurz andauernder Erregung der Ringmuskulatur in eine vollkommene Erschlaffung des Darmstückes übergeht.

3. Versuche mit einer braungefärbten, wäßrigen *Chinhydronlösung* haben gezeigt, daß diese ebenfalls eine starke, dem Chinon ähnliche Wirkung auf das Kaninchenduodenum ausübt.

Literatur.

[1] Labes, R.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **127**, 148 (1927); **152**, 111 (1930); **156**, 226 (1930). — [2] Meyer, O. B.: Z. Biol. **48**, 352 (1906); **50**, 93 (1908). — Zbl. Physiol. **23**, Nr 20. — [3] Bergstermann, H.: Habilitationsarbeit. Jena 1940. — [4] Szent-Györgyi, A. v.: Biochem. Z. **157**, 67 (1924). — [5] Evans, C. L.: J. Physiol. (Brit.) **51**, 91 (1917). — [6] Gremels, H.: Verh. dtsch. pharmak. Ges. **1935**, 165. — Naunyn-Schmiedebergs Arch. **182**, 1 (1936). — [7] Runnström: Protoplasma (D.) **10**, 106 (1930); **15**, 532 (1932). — [8] Okada, T.: Tohoku J. exper. Med. (Jap.) **38**, 33 (1940). [9] Magnus, R.: Pflügers Arch. **102**, 123 (1904). — [10] Ventzke, H.: Inaug.-Diss. Jena 1944. — [11] Staude, H.: Z. wiss. Photogr. **38**, 65 (1939) (daselbst zahlreiche Literaturangaben über Hydrochinonoxydationsprodukte). — [12] Leubner, A.: Diss. Dresden 1911. — [13] Michaelis, L.: Oxydations-Reduktionspotentiale. Berlin 1933. — [14] Ivánovics, G.: Z. Immun. forsch. **102**, 238 (1942). — [15] Cooper, E. A.: Biochem. J. (Brit.) **7**, 175, 186 (1913). — [16] Fischer, E. u. H. Schrader: Ber. dtsch. chem. Ges. **43**, 525 (1919).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Leipzig (Direktor: Prof. Dr. M. Bürger).

Untersuchungen über das Wirkungsbild gefäßaktiver Pharmaka beim Menschen.

III. Mitteilung.

Periodisches Atmen nach Pervitin und Ephedrin.

Von

Fr. Gross und K. Matthes*.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 22. April 1944.)

Sympathikomimetische Stoffe können auf die Atmung auf sehr verschiedenem Wege einwirken. Besonders für die auch sonst zentral erregenden Stoffe wie Benzedrin, Pervitin, Ephedrin ist eine direkte erregende Wirkung auf das Atemzentrum wahrscheinlich, die Hyperventilation mit Tachypnoe bewirken würde. Über die Pressorezeptoren würden die blutdrucksteigernden Substanzen eine Hemmung der Atmung hervorrufen Koch[1], Loeschke, Loose und Schoedel[2]), wie sie z. B. beim Hund nach Adrenalin und Sympatol, beim Menschen allein nach Otrivin beobachtet wird. Mindestens für das Adrenalin ist auch mit einer Wirkung auf den gesamten respiratorischen Stoffwechsel zu rechnen, nach Antal und Schleinzer[3] hat das Adrenalin beim Hunde eine im ganzen stoffwechselsenkende Wirkung, die mit der Atemhemmung zeitlich konform geht und vielleicht diese auch über dem Wege der Chemorezeptoren (O_2- und CO_2-Spannung) unterstützt. Eine direkte Wirkung auf die Chemorezeptoren wie sie z. B. für Azetylcholin, Nikotin, Lobelin usw. nachgewiesen ist (Heymans und Boukaert[4]), läßt sich für das Pervitin am Hunde nicht nachweisen. W. Hauss (persönliche Mitteilung) vermißte an unserer Klinik jede Wirkung selbst hoher Konzentrationen von Pervitin am zirkulatorisch isolierten, aber nervös intakten Karotissinus. Außerdem haben die meisten Sympathikomimetika eine direkte Wirkung auf die Lunge, indem sie nicht nur die Bronchialmuskulatur beeinflussen, sondern auch die Alveolärgange und die Alveolen selbst erweitern und so die respiratorische Oberfläche vergrößern. Dautrebande und Mitarbeiter[5] konnten an Menschen diese Lungenwirkung durch kurzdauernde Inhalation feinverstäubter Medikamentlösungen (medikamentöser Aerosole) isoliert hervorrufen, sie fanden eine Verlangsamung der Atmung mit Abnahme des

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Atemvolumens, trotz Vertiefung der einzelnen Atemzüge und Abnahme der alveolaren CO_2-Spannung infolge relativer Abnahme des schädlichen Lungenraumes. Diese durch die lokale Lungenwirkung direkt oder auf dem Wege über die Blutgase herbeigeführte Umstellung der Atmung schlägt in ihr Gegenteil um, wenn bei längerer Inhalation der Medikamente genug ins Blut resorbiert wird, um durch Reizung der Zentren Tachypnoe und Hyperventilation zu bewirken. Bei geeigneter Dosierung konnten Dautrebande, Philippot, Charlier, Dumoulin und Nogarède [6] auch bei peroraler Zufuhr von Ephedrin und Benzedrin einem mehr oder weniger regelmäßigen Wechsel von Perioden zentral bedingter Hyperventilation mit Perioden verlangsamter Atmung bewirken. Nach einer chronischen Pervitinvergiftung beim Menschen (90 mg pro die) beschreibt F. Dittmar [7] Cheyne-Stokessches Atmen. Über tetanische Erscheinungen bei Hyperventilation, die nach 12 mg Pervitin per os auftraten, berichten R. Agnoli und T. Galli [12].

Auch Blume und Zöllner [8] konnten am Meerschweinchen unter großen erregenden Pervitindosen einen Wechsel von großen Atemvolumina mit nachfolgenden etwa normalen Atemzügen beobachten. Mittlere Pervitindosen bewirkten bei Meerschweinchen eine Hemmung der Atmung und auch der Motilität, es wird die von der Dosis abhängige erregende oder lähmende Wirkung des Pervitins auf Atmung und Motilität mit der entsprechenden Wirkung des Morphins verglichen. Sowohl für erregende wie für lähmende Wirkungen ist nach Blume und Zöllner der Angriffspunkt das Zentralnervensystem.

Nach unseren eigenen Erfahrungen [8], die sich mit den Angaben in der Literatur decken, ist die Wirkung der Sympathikomimetika auf die Atmung beim Menschen fast immer eine fördernde. Wir sehen meist sowohl eine Beschleunigung als eine Vertiefung der Atemzüge. Besonders bei der intravenösen Adrenalininjektion tritt eine starke Beschleunigung und Vertiefung der Atmung auf, während nach intramuskulärer Adrenalingabe gleichzeitig mit der oft bis 1 Stunde anhaltenden Blutdruckerhöhung nur eine erhebliche Vertiefung der Atmung bei gleichbleibender Frequenz beobachtet wird. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu der Atemhemmung, die im Tierexperiment besonders beim Hund beobachtet wird. Auch Sympatol, Suprifen und Veritol zeigen bei intravenöser Injektion eine deutliche Vertiefung und Beschleunigung der Atmung. Etwas weniger deutlich ist die Atemwirkung der langsamer wirkenden Körper der Ephedrinreihe. Einige Versuchspersonen zeigen bei intravenöser Injektion blutwirksamer Dosen von Ephedrin, Pervitin und Benzedrin überhaupt keine sichtbare Veränderung der Atmung. Die meisten zeigen im Stadium des ansteigenden Blutdruckes eine mehr oder weniger starke Beschleunigung und Vertiefung der Atmung. Einige zeigen besonders nach Pervitin und Benzedrin im Stadium des konstant erhöhten Blutdruckes eine Vertiefung der Atmung

bei gleichbleibender Frequenz. Im folgenden sollen Atemreaktionen beim Menschen nach Pervitin und Ephedrin beschrieben werden, die durch Wechsel von Perioden stärkster Atemerregung mit etwa normalen Atemzügen oder deutlicher Atemhemmung zu ausgesprochenen periodischen Atmen führten. Wir haben im ganzen zwölf Versuchspersonen durch Injektion der genannten Pharmaka in verschiedener Dosierung untersucht. Von diesen zeigte eine das Phänomen periodischer Atmung nach Pervitin und Ephedrin regelmäßig, auch nach relativ kleinen Dosen (z. B. nach 0,03—0,1 mg/kg Pervitin intravenös). Zwei weitere (eineiige Zwillinge) zeigten erst nach größeren Pervitindosen (z. B. 0,2 mg/kg Pervitin) ausgesprochen periodische Atmung, weitere zwei Versuchspersonen zeigten nach größeren Pervitindosen (0,2 mg/kg intravenös) nur eine eben in den Atemkurven bemerkbare Andeutung periodischen Atmens, während die übrigen Versuchspersonen jede Andeutung einer Periodizität der Atmung vermissen ließen. Alle Versuchspersonen waren völlig gesunde Männer im Alter von 20—40 Jahren. Eine psychogene Reaktion erscheint völlig ausgeschlossen, da sich die Versuchspersonen bei allen anderen Injektionen völlig normal verhielten und in den meisten Fällen nicht wußten, was und zu welchem Zeitpunkt injiziert wurde. Die Versuchsperson F. G., deren Atemreaktionen im folgenden besonders eingehend beschrieben werden, hat seit Jahren fast täglich Unterdruckkammerversuche und andere Anoxämieversuche zu machen, sie zeigte auch bei Injektion anderer atemerregender Stoffe ebenso wie im Anoxämieversuch meist eine stärkere Atemerregung als der Durchschnitt der übrigen Versuchspersonen. Eine Neigung zu periodischem Atmen war bei ihr z. B. im Anoxämieversuch nicht vorhanden.

Die Registriermethode entsprach der der früheren Mitteilungen[8]. In der Abb. 1 zeigt die obere Kurve die Reaktion der Versuchsperson F. G. auf intravenöse Injektion von 3 mg Pervitin, die untere zeigt einen Ausschnitt aus einer längeren Kurve nach intravenöser Injektion von 15 mg Pervitin. Man sieht (obere Kurve) unmittelbar nach der Injektion eine Periode starker Hyperventilation, welcher durch einige etwa normal große Atemzüge getrennt in unregelmäßigen Abständen noch mehrere ebensolche Hyperventilationsperioden folgen. Da die Hyperventilationsperioden ein deutliches Krescendo und Dekrescendo zeigen, so entsteht trotz der Unregelmäßigkeit der Eindruck einer Atmung von Cheyne-Stokesschem Typus. Die Ähnlichkeit mit Cheyne-Stokesschem Atmen ist noch größer in der unteren Kurve, in welcher 60—80 Sek. lang dauernde Perioden stärkster Hyperventilation mit deutlichem und regelmäßigem An- und Abschwellen mit 90—150 Sek. langen Perioden von fast an Atemstillstand grenzender Hypoventilation abwechseln. Auch ein vollständiger Stillstand der Atmung zwischen den Hyperventilationsperioden wurde des öfteren beobachtet. In einem Falle (nach intravenöser Injektion von 15 mg Pervitin)

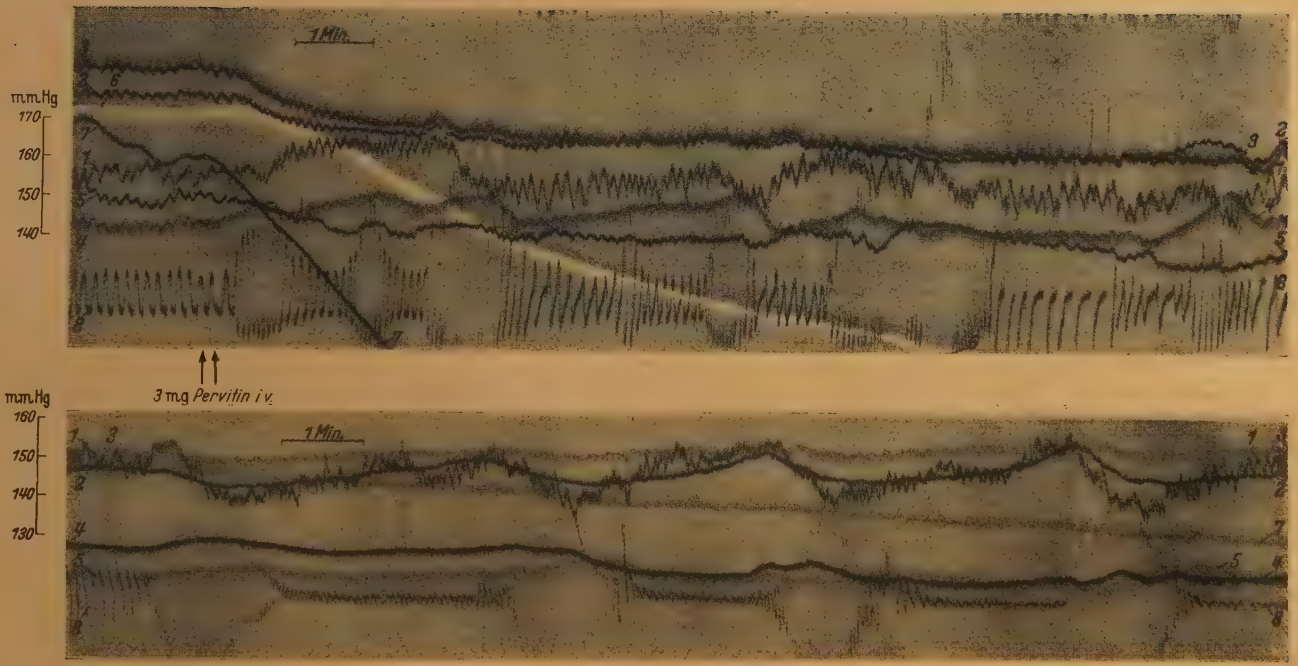


Abb. 1. Periodisches Atmen nach intravenöser Injektion von Pervitin. Obere Kurve: intravenöse Injektion (bei Marke) von 3 mg Pervitin. Untere Kurve: Kurvenausschnitt aus einem Versuch nach intravenöser Injektion von 15 mg Pervitin.
1 Systolischer Blutdruck; *2* Ohrdurchleuchtung rot (Volumen + O_2-Sättigung); *3* Ohrdurchleuchtung ultrarot (Ohrvolumen); *4* Fingerdurchleuchtung rot (Volumen + O_2-Sättigung); *5* Fingerdurchleuchtung ultrarot (Fingervolumen); *6* Ohrtemperatur; *7* Fingertemperatur; *8* Atmung. Ausschlag nach oben bedeutet eine Zunahme des Volumens, des Blutdruckes und der Temperaturen. Abweichung der Rotdurchleuchtungskurve von der Ultrarotdurchleuchtungskurve nach oben bedeutet eine Abnahme der Sauerstoffsättigung.

wechselte ein regelmäßiges An- und Wiederabschwellen der Atmung von 2 Min. Dauer mit vollständigen Atemstillständen von 40—50 Sek. ab. Blutdruck und peripherer Kreislauf zeigen zunächst ein Verhalten, wie es für Pervitin typisch ist: Wir sehen einen Blutdruckanstieg mit Vasokonstriktion und wenig veränderter Sauerstoffsättigung bei fallender Temperatur am Ohr, an der Hand zeigt sich ebenfalls eine Abnahme der Hauttemperatur und des Blutgehalts. Der Abfall der Hauttemperatur geht hier mit einem starken Absinken der Sauerstoffsättigung des Blutes einher. Später zeigen Blutdruck und peripherer Kreislauf ein Verhalten, welches augenscheinlich von den Atemperioden stark beeinflußt ist. Während der Hyperventilation sinkt meist der Blutdruck, um während der Hypoventilation manchmal schon in der zweiten Hälfte der Ventilationsperiode wieder anzusteigen. Die Schwankungen des Blutgehalts an Ohr und Hand sind nur gering. Die Sauerstoffsättigung des Blutes am Ohr zeigt an der unteren Kurve am Ende der Hypoventilationsperiode ein Minimum. Bald nach dem Einsetzen der ersten tieferen Atemzüge beginnt die Sauerstoffsättigung wieder anzusteigen. Es handelt sich dabei wohl mit Sicherheit um Schwankungen der arteriellen Sauerstoffsättigung, die durch die verschiedene Lungenventilation verursacht sind. An den Fingern sind die Schwankungen der Sauerstoffsättigung nicht so deutlich nachweisbar. Das Maximum der Blutdrucksteigerung und der Sauerstoffverarmung am Ohr fallen in der unteren Kurve zeitlich annähernd zusammen. Die Schwankungen des Blutdruckes und der Sauerstoffsättigung verhalten sich also in ihren zeitlichen Beziehungen zu den Atemphasen so wie wir es gewohnt zu sehen sind, wenn ein Gesunder willkürlich in einem Rhythmus atmet, der dem hier spontan auftretenden entspricht. Sie verhalten sich grundsätzlich anders wie beim spontanen echten Cheyne-Stokesschen Atmen beim Kreislaufkranken (vgl. Matthes [9]). (Beim echten Cheyne-Stokesschen Atmen steigt der Blutdruck während der Respirationsphase an. Das Maximum des Blutdruckes liegt in der zweiten Hälfte bzw. gegen Ende der Respirationsphase. Auch die Sauerstoffsättigung am Ohr erreicht infolge der bei diesen Kranken stark verlangsamten Blutgeschwindigkeit erst in der Mitte bzw. gegen Ende der Respirationsphase ihr Maximum) (Matthes[9]). Der Umstand, daß beim periodischen Atmen nach Pervitin die Schwankungen der Sauerstoffsättigung und des Blutdruckes sich zu den Atemphasen ebenso verhalten wie beim willkürlich erzeugten periodischen Atmen, deutet darauf hin, daß in beiden Fällen die Änderung des Atemmechanismus die primäre Veränderung ist, nach der sich Blutdruck und Sauerstoffsättigung richten, während umgekehrt das unterschiedliche Verhalten beim echten Cheyne-Stokes dafür spricht, daß hier die Änderungen der Blutgase (unter anderem der Sauerstoffsättigung) an der Steuerung der Atemrhythmik wesentlich beteiligt sind (Matthes[9]). Dafür sprach auch, daß der echte Cheyne-Stokes der Kreislaufkranken

sich durch Sauerstoffatmung und oft auch durch Anreicherung der Inspirationsluft mit CO_2 meist sofort beseitigen ließ. Im Gegensatz dazu läßt sich das periodische Atmen nach Pervitin durch Sauerstoffatmung in keiner Weise beeinflussen, auch durch CO_2 kann der Atemrhythmus erst geändert werden, wenn eine hohe CO_2-Konzentration von 8—10%, die an sich eine starke Atemsteigerung bewirkt, der Atemluft beigemischt werden. Beim echten Cheyne-Stokesschen Atmen beim Kreislaufkranken und ebenso bei dem durch Sauerstoffmangelatmung hervorgerufenen periodischen Atmen des Gesunden, ist die Länge der Atemperiode sehr konstant. Sie wird nach unseren Befunden bei diesen durch das Verhalten der Blutgase gesteuerten Typen des periodischen Atmens im wesentlichen durch die Blutgeschwindigkeit, d. h. durch den Zeitbedarf des Blutes von der Lunge bis zu den reagierenden Zentren bestimmt. Daher ist die Atemperiode bei Kreislaufkranken mit verlangsamter Blutgeschwindigkeit sehr viel länger als bei Gesunden beim O_2-Mangel Cheyne-Stokes. Im Gegensatz dazu ist die Länge der Periode beim periodischen Atmen nach Pervitin, wie aus unseren Abbildungen hervorgeht, recht inkonstant. Die Veränderung des Atemmechanismus ist hier das Primäre, welches die Schwankungen des Blutdruckes und der Sauerstoffsättigung ursächlich bedingt.

Auffallend war, daß die psychisch erregende Wirkung des Pervitins, die bei den meisten Versuchspersonen unmittelbar nach der intravenösen Injektion in voller Stärke auftritt, bei der Versuchsperson F. G. anfangs meist fehlte. Es trat eher ein Gefühl der Schläfrigkeit und Schwere in den Gliedern auf. Nach einer Injektion von 15 mg Pervitin wurde beobachtet, daß die periodisch atmende Versuchsperson unmittelbar nach der Injektion in einen halbschlafartigen Zustand verfiel, wobei der Kopf zur Seite sank und die Gesichtszüge entspannt waren. Die zunächst sehr kräftigen Hyperventilationsperioden wurden immer schwächer und kürzer, so daß die Hypoventilationsphasen, in denen die Atmung fast ganz sistierte, immer mehr überwogen. Schließlich „erwachte" die Versuchsperson nach einer 4 Min. langen Periode minimalster Atmung plötzlich mit einem heftigsten Atemzwang, der eine 6 Min. lang dauernde Periode schwerster Hyperventilation mit psychischer Erregung einleitete. Es scheinen also auch auf psychischem Gebiet erregende und dämpfende Wirkungen nebeneinander vorhanden zu sein. Auffallend ist, daß eine derartig schwere Hyperventilation keine tetanieartigen Erscheinungen und auch nicht die subjektiv sehr unangenehmen Empfindungen einer lang andauernden willkürlichen Hyperventilation hervorrief.

Deutliches periodisches Atmen konnte bei intravenöser Injektion von nur 3 mg (entspricht einer Tablette Pervitin) ausgelöst werden. Kleinere Dosen bewirkten meist nur eine vorübergehende initiale Atemsteigerung. Die Schwelle war jedoch wechselnd und es konnte an 1 Tage schon eine

Injektion von 1,5 mg deutliche Atemperioden bewirken, während ein anderes Mal selbst 7,5 mg kaum eine Andeutung von Atemperioden hervorrief. Periodisches Atmen konnte nicht nur durch intravenöse, sondern auch durch subkutane, intramuskuläre und perorale Applikation hervorgerufen werden. Verständlicherweise vergeht längere Zeit bis zum Auftreten der Atemperioden, wenn das Pervitin nicht intravenös appliziert wird. So dauerte es nach subkutaner und intramuskulärer Injektion (15 mg) 14—15 Min. bis zum ersten Auftreten der Atemperioden, während nach peroraler Einnahme von 15 mg 19—20 Min. bis zur Wirkung vergehen. Auch die Latenzzeit der übrigen Pervitinwirkungen auf Blutdruck, Volumen usw. war entsprechend groß. Dagegen ist die Wirkung peroral, subkutan und intramuskulär ebenso stark wie intravenös, die Dauer des periodischen Atmens sogar oft erheblich länger als bei intravenöser Injektion der gleichen Dosis. Versuche mit peroraler, subkutaner und intramuskulärer Applikation kleinerer Dosen als 15 mg wurden nicht angestellt.

Nach Ephedrin beobachteten wir bei dieser Versuchsperson ebenfalls eine ganz entsprechende Atemreaktion, die in Abb. 2 wiedergegeben ist. Wir sehen besonders schöne und regelmäßige Atemperioden. Ein Blutdruckabfall während der Ventilations-

Abb. 2. Periodisches Atmen nach intravenöser Injektion von 25 mg Ephedrin.

1 Systolischer Blutdruck; *2* Ohrdurchleuchtung rot (Volumen + O_2-Sättigung); *3* Ohrdurchleuchtung ultrarot (Ohrvolumen); *4* Fingerdurchleuchtung rot (Volumen + O_2-Sättigung); *5* Fingerdurchleuchtung ultrarot (Fingervolumen); *6* Ohrtemperatur; *7* Fingertemperatur; *8* Atmung.

periode ist nur bei den ersten zwei Perioden erkennbar. Schwankungen der Sauerstoffsättigung sind in den Fingerkurven angedeutet. Daß ein geringer Blutdruckanstieg mit Vasokonstriktion am Finger schon kurz vor Injektionsbeginn einsetzt, ist wohl die Folge eines um diese Zeit auftretenden Injektionsschmerzes, der sich nicht immer ganz vermeiden läßt.

Durch Benzedrin konnte auffallenderweise eine periodische Atmung bei der Versuchsperson F. G. nicht hervorgerufen werden, obwohl Dosen bis 30 mg intravenös wiederholt injiziert wurden. Eine kurze Zeit nach der Benzedrininjektion gegebene Dosis von 7,5 mg Pervitin rief dagegen prompt periodisches Atmen hervor. Auffallenderweise wurde periodisches Atmen einige Male beobachtet, wenn zwei Benzedrininjektionen in kurzem Abstand nacheinander gemacht wurden. Es trat dann nach der zweiten Injektion periodisches Atmen auf. Es scheint sich nicht einfach um eine Dosierungsfrage zu handeln, da eine Einzelinjektion, die größer war als beide Injektionen zusammen, kein periodisches Atmen hervorrief.

Durch Veritol und Suprifen konnte bei dieser Versuchsperson periodisches Atmen ebensowenig wie durch Suprarenin und Sympatol hervorgerufen werden. Von unseren anderen Versuchspersonen zeigten besonders die Zwillinge H. und W. Ga. nach höheren Pervitindosen deutliche Periodenbildung der Atmung. Bei H. Ga. kam es unmittelbar nach der Injektion von 1 ccm (15 mg) Pervitin gleichzeitig mit dem Anstieg des Blutdruckes um 40 mm Hg zu einer mäßiggradigen Beschleunigung und Vertiefung der Atmung, die schon 50 Sek. nach dem Ende der Injektion, während der Blutdruck sein Maximum noch nicht erreicht hatte, zurückging. Gleichzeitig zeigt die Pulsfrequenz eine geringe Abnahme. Nachdem Atemfrequenz und -tiefe etwa eine weitere Minute lang ungefähr dem Ausgangswert entsprachen, kommt es, während der Blutdruck noch auf seinem Maximalwert steht, zu einer sehr starken Beschleunigung der Atemfrequenz und Atemgeschwindigkeit, die regelmäßig an- und abschwellend etwa 2 Min. anhält. In dieser Zeit fällt der Blutdruck um 20 mm Hg. und die Pulsfrequenz zeigt einen sehr erheblichen Anstieg. Es folgt dann eine 3 Min. lang anhaltende Periode, in der Atemfrequenz und -tiefe etwa der Zeit vor der Pervitininjektion entsprechen und in welcher der Blutdruck fast auf seinen Maximalwert ansteigt und die Pulsfrequenz wieder abfällt. Darauf steigt die Atmung langsam wieder an und es folgt eine 4 Min. lang dauernde Periode stärkster Hyperventilation, die wegen des Auftretens deutlicher tetanischer Erscheinungen (Pfötchenstellung der Hände, deutliches Chvostekssches Zeichen) zum Abbrechen der Registrierung zwang. Während der Hyperventilationsperiode war der Blutdruck wieder abgefallen, die Pulsfrequenz angestiegen. Nach dem Abbrechen der Registrierung traten noch zweimal schwächere Anfälle von Hyperventilation auf. Bei dem Zwillingsbruder W. Ga. (dem Erscheinungstyp nach eineiige Zwillinge) war der Blutdruckanstieg nach 15 mg Pervitin geringer (20 mm

Hg). Sonst verlief aber die Kreislauf- und Atemreaktion in nahezu identischer Weise. Es wurden drei Hyperventilationsperioden registriert, die in Dauer und Intensität denen seines Bruders entsprachen. Auch in diesem Falle stieg während der Hyperventilation die Pulsfrequenz an, während der Blutdruck in einer Periode unter seinen Ausgangswert abfiel. Die Atmung zwischen den Hyperventilationsperioden war besonders nach der zweiten und dritten sehr starken Hyperventilation in Frequenz und Tiefe deutlich gegenüber dem Ausgangswert vor Pervitin herabgesetzt. Ein Atemstillstand trat jedoch nicht ein. In diesen Zeiten stieg der Blutdruck wieder an, während die Pulsfrequenz abfiel. Ausgesprochene tetanische Erscheinungen sind bei W. Ga. nicht aufgetreten.

Bei kleineren Pervitindosen (7,5 mg intravenös) wurde bei H. und W. Ga. keine periodische Atmung beobachtet, ebensowenig nach Injektion von bis 25 mg Ephedrin. Benzedrin bewirkte bei H. und W. Ga. in Dosen von 15 mg anhaltende Blutdrucksteigerungen von 40 mm Hg, aber keinerlei periodische Atmung. Auch wiederholte Injektionen von 10 mg Benzedrin bewirkten kein periodisches Atmen. Bei zwei weiteren Versuchspersonen wurden geringfügige, subjektiv nicht spürbare periodische Größenschwankungen der Atmung nach Injektion von 15 mg Pervitin und 20 mg Benzedrin in den Atemkurven beobachtet.

Über den Entstehungsmechanismus der periodischen Atmung nach Pervitin, Benzedrin und Ephedrin beim Menschen läßt sich Bestimmtes nicht aussagen. Sicher ist, daß nicht der Sauerstoffmangel den Rhythmus der Atemperioden bestimmt, wie wir das für das periodische Atmen mancher Kreislaufkranker und den Anoxämie-Cheyne-Stokes des Gesunden wahrscheinlich machen konnten. Auch der Karotissinus scheint als primärer Angriffspunkt des Pervitins nicht in Frage zu kommen, wenn es erlaubt ist, die negativen Ergebnisse der Tierversuche von Hauss auf den Menschen zu übertragen Zu denken wäre an eine Interferenz der peripheren Lungenwirkung dieser Pharmaka mit ihrer zentral erregenden Wirkung im Sinne der Vorstellung von Dautrebande und Mitarbeitern[5, 6].

Daneben muß man daran denken, daß die genannten Pharmaka beim Menschen neben den zentral erregenden auch zentral dämpfende Wirkung haben und es ist bemerkenswert, daß besonders bei der Versuchsperson F. G. die Wirkung des Pervitins besonders zuzeiten der Atemhemmung auch auf die Psyche eine dämpfende und einschläfernde war. Es erscheint so verständlich, daß auch auf dem Gebiet der Atemregulation erregende und dämpfende Wirkungen miteinander abwechseln können.

Zusammenfassung.

Nach intravenöser, aber auch subkutaner und peroraler Applikation von Pervitin und Ephedrin kann es bei disponierten Versuchspersonen zu

periodischem Atmen nach Art eines Cheyne-Stokes kommen. Die Atemstörung kann unter Umständen schon bei den in der Therapie üblichen Dosen auftreten. Die Kreislaufreaktionen bei diesem Atemtypus werden durch fortlaufende Registrierung dargestellt und der Wirkungsmechanismus diskutiert.

Literatur.

[1] Koch, Eb.: Erg. Kreisl.forsch. **1** (1931). — [2] Loeschke, H., K. Loose u. W. Schödel: Pflügers Arch. **245**, 210 (1941). — [3] Antal, J. u. R. Schleinzer: Pflügers Arch. **244**, 499 (1941). — [4] Heymanns, C. u. J. Bouckaert: Erg. Physiol. **41**, 28 (1939). — [5] Dautrebande, E., E. Philippot, R. Charlier, E. Dumoulin et F. Nogarède: Arch. internat. Pharmacodynam. **68**, 247 (1942). — [6] Dautrebande, E., E. Philippot, R. Charlier, E. Dumoulin et F. Nogarède: Arch. internat. Pharmacodynam. **68**, 451 (1942). — [7] Dittmar, F.: Führer-Wielands Samml. v. Vergiftungsfällen **12**, Lfg. 9 (1942). — [8] Blume, W. u. R. Zöllner: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **201**, 21 (1943). — [9] Matthes, K. u. F. Gross: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **203**, 206 (1944). — [10] Matthes, K.: Z. exper. Med. **112**, 486 (1943). — [11] Blume, W.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **200**, 389 (1942). — [12] Agnoli, R. u. T. Galli: Führer-Wielands Samml. v. Vergiftungsfällen **10**, Lfg. 7 (1941).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Zum Wirkungsmechanismus cholinergischer Stoffe. V.

Von

Hans Asen.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 6. April 1944.)

Unter Potentialgiftwirkung wird verstanden, daß nicht die Anwesenheit eines Stoffes in der Zelle oder an der Zellmembran wirksam ist, sondern daß die Wirkung durch die Konzentrationsdifferenz oder das Diffusionsgefälle in die Zelle hinein zustande kommt. Gremels[1] sieht den eigentlichen Wirkungsort der Potentialstoffe in der physikalischen Grenzschicht des Zellindividuums. Er bringt sogar die kinetische Energie der einströmenden Moleküle des Wirkstoffes in direkte Verbindung mit der Wirkung. Nach Ausgleich der Konzentrationsdifferenz ist also der Stoff wirkungslos, obwohl er sich in der Zelle noch nachweisen läßt. Diese Ansicht stützt sich auf Versuche von Straub[2] am Aplysienherzen, Kahlson[3] am Froschherzen und weniger direkte Andeutungen anderer Befunde.

Nun wurden schon von Loewi[4] die Befunde, die Straub[2] am Aplysienherzen erhob, anders gedeutet. Er führte die sehr ähnliche Wirkungsabnahme eines elektrischen Vagusreizes auf eine verstärkte Reizbildung in den Automatiezentren des Herzens zurück. Lendle[5] fand, daß zwar das spontan schlagende Froschherz sich nach Azetylcholineinwirkung erholt, und die negativ intrope Wirkung abklingt, daß aber am elektrisch gereizten Ventrikelpräparat (Stannius II) keinerlei Wirkungsabnahme zu beobachten ist. Lendle lehnt daher die Potentialgiftnatur des Azetylcholins (A.Ch.) ab und erklärt die von Kahlson beobachtete Wirkungsabnahme im Sinne Loewis als eine verstärkte Automatie.

In seiner Arbeit über Potentialstoffe hat Gremels[1] die Elektrolyteinwirkungen nicht als Potentialstoffeinwirkungen angesprochen, „da sie nicht durch ihre Membranpassage, sondern vielmehr durch ihren Einfluß über die Elektrolytverteilung an der Membran wirksam werden." Nun sind jedoch gerade die wichtigsten Vertreter der Gruppe der Potentialgifte, nämlich A.Ch., Cholin u. a. starke Basen und würden somit als typische Vertreter der Potentialgifte überhaupt ausfallen. Damit stimmen Untersuchungen von Clark[6] überein, der wegen der Schnelligkeit des Wirkungseintritts (Latenzzeit der Wirkung unter 0,1 Sek.) beim A.Ch. eine Oberflächenwirkung annahm. Einen weiteren Beweis für die Oberflächenwirkung des A.Ch. sah Clark[6] in den Versuchen, die Cook[7] mit Methylenblau und A.Ch. am Froschherzen machte.

Methylenblau ist mit seiner atropinähnlichen kontinuierlichen Wirkung Antagonist von A.Ch. Schon in so geringen Konzentrationen, daß noch keine Färbung des Herzmuskels eintrat, wurde eine Hemmung der A.Ch.-Wirkung durch Methylenblau erzielt. Andererseits verschwand dieser atropinähnliche Effekt, wenn der irreversibel gefärbte Herzmuskel mit farbstofffreier Lösung gewaschen wurde. Nach neu zugeführter Farbstofflösung trat dieser Effekt auch am bereits vorher tiefgefärbten Herzen auf.

CLARK erklärte nun diese Versuchsergebnisse mit dem Vorhandensein von einer Art spezifischer Rezeptoren, die er in die Zelloberfläche lokalisierte und machte damit auch ohne die Annahme einer Potentialwirkung das Ausbleiben eines pharmakologischen Effekts trotz Imbibition des Zellinneren mit Methylenblau bzw. A.Ch. verständlich, solange nur die Oberfläche davon freiblieb.

LULLIES und MEINERS[8] glaubten dem Begriff der Potentialwirkung „einen gewissen Inhalt" geben zu können, indem sie eine nach Applikation des Giftes eintretende Gegenwirkung annahmen, z. B. Vermehrung der Cholinesterase; gewisse Befunde von CORSTEN[9] an der Froschlunge scheinen solche Gedanken stützen zu können. Auch EICHLER[10] spann diesen Faden fort, allerdings nur am Rande einer sehr gründlichen Auseinandersetzung mit der allgemeinen Problematik der Potentialwirkung, bei der er abwegige Ansichten kritisierte und die Wege zu einer klaren gedanklichen Fassung und mathematischen Formulierung wies.

Das Problem wäre zu eng gefaßt, wenn man es auf den Sonderfall des Azetylcholins beschränken wollte: Wurde doch der Begriff des Potentialgiftes lange vor der Entdeckung des Azetylcholins an einer Base entwickelt, die der Wirkung der Esterase nicht zugänglich ist; und jederzeit hat sich der Parallelismus des Wirkungsmechanismus *verschiedener* Stoffe gezeigt, wie z. B. neuerdings in den Arbeiten von JUNG[11], MORATSCHEK[12] und VOIGT[13], desgleichen in den hier zu schildernden Versuchen.

BROWN, DALE und FELDBERG[14] stellten Unterschiede über die Spannungsleistung des in situ befindlichen Gastroknemius der Katze bei verschieden schneller intraarterieller Injektion von A.Ch. fest. Dieses Ergebnis wurde von GREMELS[1] durch die Potentialtheorie erklärt. Er sieht den Grund der verschieden großen Wirkungsintensität in der Steilheit des Konzentrationsgefälles zwischen Zelläußerem und Zellinnerem, das bei schneller Injektion größer, bei langsamerer kleiner ist. Nun kann man aber ebenso der Ansicht sei, daß bei der schwächeren intraarteriellen Konzentration die wirkungsfähige Konzentration in oder auf der Zelle im Vorbeispülen nur in geringem Maße, bei der stärkeren in höherem Maße erreicht, und somit auch ein Wirkungsunterschied hervorgerufen wird. Es erscheint folglich sehr fraglich, ob das Ergebnis des Versuchs von BROWN, DALE und FELDBERG als Beweis für die Potentialtheorie gedeutet werden darf.

Die Wirksamkeit des A.Ch. am Froschmuskel gab Anlaß, die allgemeine Frage der Gültigkeit und Reichweite der Potentialtheorie an diesem Objekt zu prüfen, nachdem sie bisher vorwiegend am Froschherzen und Meerschweinchendarm studiert wurde*.

Methodik.

Als Versuchsobjekt diente der M. rectus abdom. von Rana temporaria und Rana esculenta. Die Muskeln wurden gewogen und in einem Bad mit karbonatfreier phosphatgepufferter Tyrodelösung (p_H 6,9) aufgehängt. Zur Hemmung der Cholinesterase wurde der Tyrodelösung ständig 10^{-5} Physostigmin (Eserin) zugesetzt. In dieser Konzentration ruft Physostigmin keine eigenen Kontraktionen am Frosch- oder Blutegelmuskel hervor. Die Badeflüssigkeit wurde zur Sauerstoffversorgung ständig mit Luft durchperlt. Die Belastung des Muskels betrug je nach Gewicht des Muskels (von 0,15 bis 0,24 g) etwa 3 g. Die Reizung der Muskeln erfolgte durch Wechsel der Badeflüssigkeit, die in der ersten Versuchsreihe mit A.Ch. in der Konzentration 10^{-5} versetzt wurde. In der gleichen Weise wurden die Stoffe Carbaminoylcholin (Doryl-Merck) in der Konzentration 10^{-4} und Cholin in der Konzentration 10^{-2} untersucht.

Bei der Dauerreizung eines Froschmuskels mit cholinergischen Substanzen tritt allmählich ein mehr oder minder großes Nachlassen der anfänglichen Kontraktion des Muskels ein. Das Wesen dieses Nachlassens der Kontraktion wurde durch gleichzeitiges Schreiben zweier vom gleichen Tier entnommenen und der gleichen Vorbehandlung unterworfenen M. rect. abdom. in der Art untersucht, daß nach annähernd übereinstimmender Kontraktionshöhe bei kurzen Reizen der eine Muskel unter Dauerreiz gesetzt wurde, während der andere nicht gereizt wurde. Es zeigte sich nun, daß auch die Schreibhöhe des ungereizten, also nicht kontrahierten Muskels annähernd ebenso stark abfiel, wie die des gereizten. Daraus wurde geschlossen, daß es sich bei diesem Vorgang weniger um eine Wirkungsabnahme des A.Ch. als um einen Dehnungsvorgang handelte. Diese Dehnung war bei den Muskeln verschiedener Individuen verschieden stark ausgeprägt. Außerdem bestand eine stärkere Dehnung bei der Rana esculenta als bei der Rana temporaria. Ferner schien noch die jahreszeitlich zunehmend wärmere Witterung die Dehnung zu begünstigen. Die Versuche wurden von April—Juni 1942 ausgeführt.

Nach Einwirkung der entsprechenden differenten Stoffe wurden die Muskeln kurz in Eserintyrodelösung abgespült, mit Filtrierpapier abgetrocknet, im Mörser mit Quarzsand zerrieben, das Substrat im Filter mit Eserintyrodelösung extrahiert und dabei auf das 100fache Volumen des Froschmuskels verdünnt. Das Filtrat wurde in engster Anlehnung an die

* Über die hier mitgeteilten Befunde wurde bereits von F. Jung: Klin. Wschr. **1942**, 1030, berichtet, der beratend an der Arbeit beteiligt war.

von v. MURALT[15] beschriebene Technik am Blutegelmuskel getestet. Die angeführte Methode der Blutegeltestung konnte nicht nur vollständig reproduziert, sondern auch noch bei Anwendung entsprechend höherer Konzentrationen auf die Stoffe Carbaminoylcholin und Cholin erweitert werden.

In ergänzenden Versuchen wurden statt der Froschmuskeln menschliche Erythrozyten untersucht: Mit Natriumzitrat versetztes Menschenblut wurde zentrifugiert und so vom Plasma befreit. Danach wurde noch zweimal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen, das Sediment mit Eserintyrode versetzt und nach etwa einstündigem Einwirken mit verschieden starken Konzentrationen von A.Ch. in Eserintyrode behandelt. Nach Ablauf der Einwirkungszeit wurde das Gemisch erneut gut zentrifugiert, aus dem Sediment 0,1 ccm Erythrozyten entnommen und mit 1 ccm Aqua dest. hämolysiert. Die Hämolyse trat fast augenblicklich ein. Danach wurde mit Eserintyrode auf 10 ccm aufgefüllt, so daß eine Verdünnung von 1:100 entstand. Die gewonnene Flüssigkeit wurde ebenfalls nach der Methode von v. MURALT getestet. Bei hohen Konzentrationen (A.Ch. 10^{-4}) wurde nach mindestens halbstündiger Einwirkung vor der Hämolyse noch einmal kurz mit Eserintyrode gewaschen, um einen Fehler auszuschalten, der durch rein mechanisches Anhaften von Flüssigkeit an den Erythrozyten möglich wäre.

Ablauf der Wirkung von Reizungen mit A.Ch. am Froschmuskel.

Die Muskeln wurden mit A.Ch. $1 \cdot 10^{-5}$, dem ständig Eserin zugesetzt war, gereizt und reagierten mit einer Kontraktion, die in etwa 2 Min. vollständig ausgebildet war. Danach wurde mit Eserintyrode ausgewaschen, worauf die Muskeln mit völliger Erschlaffung reagierten. Bei neuer Reizung war ihre Erregbarkeit nicht herabgemindert. Eine Dauerreizung von $5^3/_4$ Stunden ergab nur ein geringes Nachlassen der Kontraktion (Abb. 1).

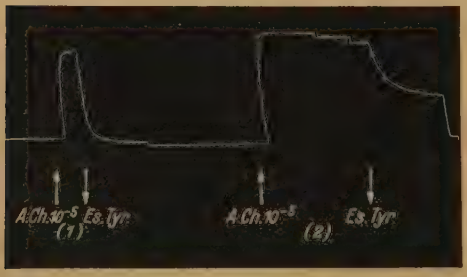


Abb. 1. *1* Kurzfristige Reizung des M. rect. abd. von Rana temporaria mit A.Ch. ^{5} mit schneller Erschlaffung beim Auswaschen mit Eserintyrode (Es.Ty.); *2* Reizung des gleichen Muskels mit A.Ch. 10^{-5} über $5^3/_4$ Stunden. Geringe Verminderung der Kontraktionshöhe (Dehnung, vgl. Methodik), verlangsamte Erschlaffung beim Auswaschen.

Da die Außenkonzentration wegen der Größe des Gefäßes (mit etwa dem 100fachen Volumen des Muskels) praktisch gleich blieb, hätte nach der Potentialtheorie zumindest nach Ablauf von $5^3/_4$ Stunden ein Vollsaugen der Muskelzellen mit A.Ch., das ja wegen des vorhandenen Eserins nicht oder nur sehr unvollkommen zerstört werden konnte, stattfinden und damit die dynamische Wirkung des A.Ch. abklingen müssen.

Als nächstes wurde versucht, die Ergebnisse, die KAHLSON[3] am Froschherzen über die Beziehung Giftsättigung: Wirkungsintensität erhielt, am Froschmuskel zu reproduzieren. Es wurde der Gehalt des mit A.Ch. 10^{-5} gereizten Muskels zu verschiedenen Zeitpunkten am Blutegelmuskel getestet. Einen typischen Versuch zeigt die Abb. 2.

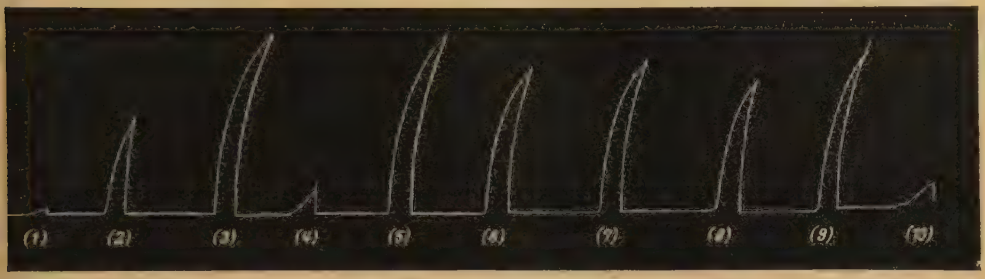


Abb. 2. Testung der Muskelextrakte am Blutegelmuskel (Azetylcholin). Gewicht der Muskeln zwischen 0,16 und 0,2 g.
1 Nicht vorbehandelter Muskel, 1:100 verd.; *2* Muskel 2 Min. A.Ch. 10^{-5}, 1:100 verd.; *3* Vergleichstest A.Ch. 10^{-7}; *4* Vergleichstest A.Ch. 10^{-8}; *5* Muskel 2 Min. A.Ch. 10^{-5}, 1:100 verd.; *6* Muskel 90 Min. A.Ch. 10^{-5}, 1:100 verd.; *7* Muskel 2 Min. A.Ch. 10^{-5}, 1:100 verd.; *8* Muskel 2 Min. A.Ch. 10^{-5}, 1:100 verd.; *9* Vergleichstest A.Ch. 10^{-7}; *10* Vergleichstest A.Ch. 10^{-8}.

Es ist deutlich zu erkennen, daß schon 2 Min. nach Einwirkungsbeginn die endgültige Menge A.Ch. im Muskel nachzuweisen ist (Abb. 2, Ziffer *5*). In diesem Augenblick ist aber der Muskel noch nicht einmal ganz oder gerade auf dem Maximum seiner Kontraktion (Abb. 3).

Abb. 3. Froschmuskel, 0,16 g schwer, 120 Sek. mit A.Ch. 10^{-5} gereizt. Maximum der Kontraktionshöhe erreicht.

Ein Muskel, der $1^1/_2$ Stunden unter A.Ch. 10^{-5} gestanden hatte und unter genau

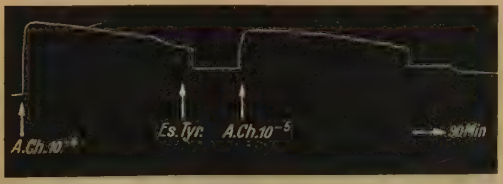


Abb. 4. Froschmuskel, 90 Min. mit A.Ch. 10^{-5} gereizt. Absinken der Kontraktionshöhe unter die Ausgangshöhe.

gleichen Bedingungen arbeitete, ging in seiner Kontraktionshöhe in diesem Falle sogar zum Ausgangswert zurück (Abb. 4). Auch dieser Muskel (Abb. 2, Ziffer *6*) rief beim Test nur eine etwa ebenso große Kontraktion des Blutegelmuskels hervor wie der, der 2 Min. unter A.Ch. stand. Um eine vom zugeführten A.Ch. unabhängige Reizung des Egels auszuschließen, ist ein Leerversuch vorangeschickt (Abb. 1, Ziffer *1*). Es

ist klar ersichtlich, daß der Leerwert weit unter $^1/_{10}$ der zum Test kommenden Konzentration liegt, und daher praktisch zu vernachlässigen ist. Vergleicht man weiter die Höhe der Ausschläge auf den Extrakt der vorbehandelten Muskeln (Abb. 2, Ziffern *5*—*8*) mit denen auf eine bekannte A.Ch.-Lösung (Abb. 2, Ziffern *3* und *9*), so muß bei der innerhalb der Fehlerbreite etwa gleichmäßigen Höhe aller Ausschläge angenommen werden, daß bereits nach 2 Min. der Muskel maximal gesättigt ist, d. h. daß alles zur Verfügung stehende Lösungswasser aufgebraucht ist. Dieser Befund scheint mit der Potentialtheorie unvereinbar, denn in diesem Augenblick müßte das Potential zusammenbrechen und die dynamische Wirkung des A.Ch. aufhören. Nach diesen Versuchen wäre A.Ch. eher den „Zustandsstoffen" (GREMELS[1]) als den Potentialstoffen zuzurechnen.

Ablauf der Wirkung von Reizungen mit Carbaminoylcholin und Cholin am Froschmuskel.

Es lag nun nahe, auch andere cholinergische Stoffe zu prüfen, bei denen insofern eine Vereinfachung der Versuchsanordnung ermöglicht wurde, als

Abb. 5. Testung der Muskelextrakte am Blutegel (Doryl). (Gewichte der Muskeln von 0,16—0,21 g.) *1* Vergleichstest Doryl 10^{-6}; *2* nicht vorbehandelter Muskel, 1:100 verd.; *3* Muskel 3 Min. Doryl 10^{-4}, 1:100 verd.; *4* Muskel 3 Min. Doryl 10^{-4}, 1:100 verd.; *5* Muskel 2 Min. Doryl 10^{-4}, 1:100 verd.; *6* Muskel $1^3/_4$ Stunden Doryl 10^{-4}, 1:100 verd.; *7* Vergleichstest Doryl 10^{-6}.

die Esterasewirkung unberücksichtigt bleiben konnte. Die Ergebnisse der Versuche mit diesen Stoffen waren ganz analog denen mit A.Ch. Die

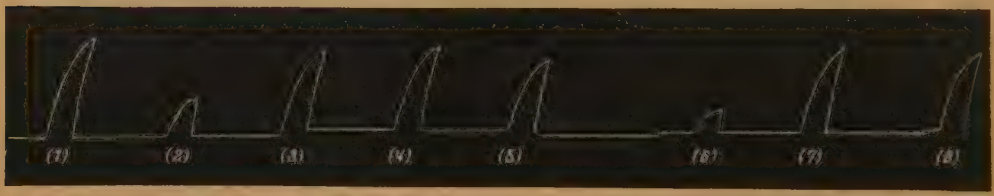


Abb. 6. Testung der Muskelextrakte am Blutegel (Cholin). (Gewichte der Muskeln von 0,17—0,19 g.) *1* Vergleichstest Cholin 10^{-4}; *2* Vergleichstest Cholin 10^{-5}; *3* Muskel 6 Min. Cholin 10^{-2}, 1:100 verd.; *4* Muskel 4 Min. Cholin 10^{-2}, 1:100 verd.; *5* Muskel 3 Min. Cholin 10^{-2}, 1:100 verd.; *6* Muskel ohne Vorbehandlung, 1:100 verd.; *7* Vergleichstest Cholin 10^{-4}; *8* Muskel 75 Min. Cholin 10^{-2}, 1:100 verd.

maximale Kontraktion wurde hier entsprechend der geringeren Wirksamkeit erst etwas später erreicht (nach 3 Min. beim Doryl, über 4 Min. beim Cholin). Dementsprechend war auch erst nach dieser Zeit eine gleichmäßig hohe Kontraktion des Egels bei allen getesteten Muskelextrakten zu

erzielen. Auch hier fand sich beim Erreichen der maximalen Kontraktion bereits ebensoviel wirksame Substanz wie nach langer Einwirkung. Bei Cholin trat die Kontraktionsabnahme des Froschmuskels etwas schneller ein. Der Grund hierfür war wohl vorwiegend in einer allgemein rascheren Erschlaffung der Muskeln zu suchen (vgl. Methodik). Einen typischen Verlauf zeigen die Abb. 5 und 6.

Diese Folgerung wird noch gestützt durch den völlig gleichsinnigen Befund von Genuit und Junker[16] am Froschherzen: Sie fanden in der (konstanten) Durchströmungsflüssigkeit nach 2 und 10 Min. den *gleichen* Gehalt an Azetylcholin, der vollkommen einer gleichmäßigen Verteilung der gegebenen Dosis auf das Gesamtsystem Nährflüssigkeit + Herzmasse entsprach.

Versuche über den Eintritt von A.Ch. in Erythrozyten.

Zuerst wurde in einem Leerversuch festgestellt, daß nicht mit A.Ch. vorbehandelte Erythrozyten keine Kontraktion ergeben. Dann aber waren eigenartigerweise auch nach sehr langer Einwirkung von A.Ch. 10^{-5} (bis zu 24 Stunden) keinerlei Anzeichen für eine Einwanderung von A.Ch. in die Zellen vorhanden. Durch Testung der über dem Sediment stehenden Flüssigkeit, die entsprechend verdünnt, eine völlig normale Kontraktion beim Blutegelmuskel hervorrief, wurde die Möglichkeit eines starken Abbaus ausgeschaltet. Das gleiche Ergebnis hatte ein Versuch mit der 10fachen Konzentration, wo ebenfalls nach 20stündiger Einwirkungszeit das Hämolysat der Erythrozyten keinerlei Kontraktion des Blutegelmuskels erzielte. Es muß daher angenommen werden, daß in die menschlichen Erythrozyten eine meßbare Einwanderung von A.Ch. nicht erfolgt.

Diskussion.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse dieser Versuche drängt sich der Gedanke auf, daß Kahlson[3] bei der Annahme eines allgemein gültigen ursächlichen Zusammenhangs zwischen Konzentrationsausgleich und Wirkungsabnahme des A.Ch. einer Täuschung zum Opfer gefallen ist. Das Zusammenfallen beider Tatsachen muß beim Vergleich der Abb. 7 und 8 wenn nicht als ein zufälliges, so doch nur für den Herzmuskel gültiges Ergebnis betrachtet werden.

Wie aus Abb. 8 ersichtlich ist, ist bei den beschriebenen Versuchen der Kontraktionsausgleich völlig unabhängig von der Wirkungsabnahme, da bereits vor Beginn der Wirkungsabnahme die maximale Sättigung erreicht ist. Ein Wirkungsmechanismus des A.Ch. und anderer cholinergischer Substanzen im Sinne der Potentialtheorie muß daher, wenigstens für den Skelettmuskel, abgelehnt werden. Ja, bei näherem Vergleich der Versuche mit den Muskeln und den Erythrozyten taucht die Frage auf, ob die

cholinergischen Stoffe überhaupt in die Zelle einwandern, oder ob sie bloß an die Oberfläche der Muskelzellen adsorbiert werden.

Gleichwohl muß bedacht werden, daß die Ergebnisse, die am Erythrozyten gewonnen wurden, sich nicht ohne weiteres auf die Muskelzelle übertragen lassen, weil keine genauen Bestimmungen über das p_H in beiden vorliegen. Denn wenn auch vor Einwirkung des A.Ch. sowohl der Erythrozyt als auch die Muskelzelle durch das lange Baden in Eserintyrode das p_H des Lösungspuffers (6,9) aufweisen, so sind doch nach Einwirkung von A.Ch. Veränderungen des p_H in der Muskelzelle denkbar, da sie ja dann arbeitet. Nach Untersuchungen über Ionenaustausch und Ionengleichgewicht in der Zelle (WILBRANDT u. a.[17]) hängt aber der Austausch von Kationen von der Anwesenheit von H^+ ab. Die

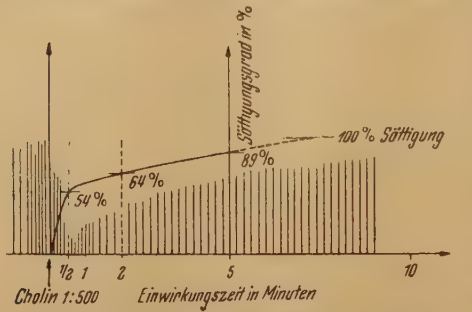


Abb. 7. Zeitliche Beziehung zwischen Konzentration von A.Ch. im Herzmuskel und Wirkungsabnahme. (Nach KAHLSON.)

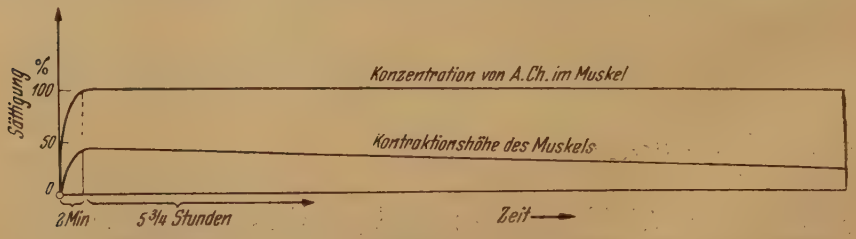


Abb. 8. Zeitliche Beziehung von Konzentration von A.Ch. im Muskel und Kontraktionshöhe des Muskels.

dazu erforderliche Menge von H-Ionen kann aber nur durch Neubildung von Säure erzeugt werden. Ob dabei in nennenswertem Maße an Milchsäure gedacht werden darf, erscheint fraglich, da heute wohl allgemein als sicher angenommen wird, daß diese erst in der Restitutionsphase auftritt.

Zusammenfassung.

1. Es wurden Versuche über die Einwanderungsgeschwindigkeit von Azetylcholin in den M. rectus abdominis des Frosches angestellt. Zu verschiedenen Zeiten, nämlich kurz vor oder während der maximalen Kontraktion und nach Dauereinwirkung und teilweiser Dehnung wurden die Muskeln extrahiert und der Extrakt am Blutegelmuskel getestet. Es ergab sich bei kurz- und langfristiger Einwirkung kein Konzentrationsunterschied an A.Ch. Bereits auf der Höhe der Kontraktion war die Konzentration von A.Ch. im Muskel etwa gleich der der Badeflüssigkeit.

2. Die gleichen Versuche wurden mit Carbaminoylcholin und Cholin angestellt. Sie führten zu den gleichen Ergebnissen.

3. Auf Grund dieser Ergebnisse muß die Potentialgiftnatur dieser Stoffe bezweifelt werden.

4. Im eserinvergifteten menschlichen Erythrozyten ließ sich auch nach 24stündiger Behandlung mit hohen A.Ch.-Konzentrationen kein A.Ch. nachweisen. Dieses Ergebnis läßt sich nicht ohne weiteres auf die Muskelzelle übertragen.

5. Es erscheint jedoch fraglich, ob die cholinergischen Stoffe im Muskelzellinneren angreifen, oder ob sie nicht zumindest bei der quergestreiften Muskelzelle ihre dynamische Wirkung an der Zelloberfläche ausüben.

Literatur.

[1] Gremels: Erg. Physiol. **42**, 53 (1939). — [2] Straub, W.: Pflügers Arch. **119**, 127 (1907). — [3] Kahlson: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **169**, 44 (1933). — [4] Loewi: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **70**, 323 (1912). — [5] Lendle: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **197**, 519 (1941). — [6] Clark: General pharmacology, im Handbuch der experimentellen Pharmakologie (Erg.-Werk) Bd. 4. Berlin: Springer 1937. — [7] Cook: J. Physiol. (Brit.) **62**, 160 (1926). — [8] Lullies, H. u. L. Meiners: Pflügers Arch. **246**, 525 (1943). — Brecht, K.: Pflügers Arch. **246**, 553 (1943). — [9] Corsten, M.: Pflügers Arch. **245**, 198 (1941). — [10] Eichler, O.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **202**, 420 (1943). — [11] Jung, Fr.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **196**, 303; **197**, 67 (1940). — [12] Moratschek, J.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **203**, 278 (1944). — [13] Vogt, M.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **293**, 282 (1944). — [14] Brown, Dale u. Feldberg: J. Physiol. (Brit.) **87**, 394 (1936). — [15] v. Muralt: Pflügers Arch. **245**, 604 (1942). — [16] Genuit u. Junker: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **202**, 97, 103f. (1943). — [17] Wilbrandt: Erg. Physiol. **40**, 204 (1938).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Innsbruck.
(Direktor: Prof. Dr. A. Jarisch.)

Unmittelbare Kreislaufwirkungen des Apomorphins.

Von

J. Decristoforo und S. Welter.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 9. Mai 1944.)

Die Wirkung des Apomorphins geht, wie bekannt und in letzter Zeit von Wagner und Wense[1] sowie Ehlich und Wällisch[2] in Versuchen am Menschen unter Verwendung einwandfreier Präparate eingehend untersucht wurde, mit lebhaften Kreislaufreaktionen einher. Da ähnliche Erscheinungen auch beim reflektorischen Erbrechen auftreten, ist jene Wirkung als Begleiterscheinung des Brechaktes an sich erklärbar. Man scheint sich aber die Frage noch gar nicht vorgelegt zu haben, ob das Apomorphin nicht auch selbständige Kreislaufwirkungen besitzt, und Magnus[3] kommt in seinem Handbuchbeitrag von 1920 zu dem Ergebnis: „Der Kreislauf wird beim Warmblüter durch Apomorphin direkt nur wenig verändert."

Seither berichtete Sohma[4], der die Wirkung mehrerer Brechmittel auf den Blutdruck untersuchte, über Blutdrucksenkung nach dem Einbringen von Apomorphin in den Darm des Kaninchens. Ferner scheint die starke Wirkung des Apomorphins bei der paroxysmalen Tachykardie eine unmittelbare Erregung der herzhemmenden Zentren nahezulegen, und Heinekamps beobachtete Verlangsamung des Herzschlages nach Bespülen der Oblongata der Schildkröte mit Morphin und Apomorphin.

Wir haben uns die Aufgabe gestellt, im Tierversuch die unmittelbaren Wirkungen des Apomorphins auf den Kreislauf unter Bedingungen zu prüfen, unter denen Erbrechen nicht auftritt, nämlich am Kaninchen, das keinen Brechapparat besitzt und an der tief narkotisierten Katze. Die Kaninchen waren mit 0,6 Urethan und 0,01 Morphin/kg subkutan, und die Katzen mit 0,05 Chloralose und 0,25 Urethan/kg intramuskulär narkotisiert worden. Verwendet wurde das Mercksche Präparat von Apomorphinum hydrochloricum.

Pulsfrequenz.

Nach der intravenösen Injektion von 2—5 mg fällt der Blutdruck steil ab und gleichzeitig wird der Herzschlag langsam (Abb. 1, 2 und 4); diese

[1] Wagner, R. u. Th. v. Wense: Wagners Methodik und Ergebnisse fortlaufender Blutdruckschreibung beim Menschen. Leipzig 1942. — [2] Ehlich, W. u. R. Wällisch: Z. Kreisl.forsch. **35**, 625 (1943). — [3] Magnus, R.: Heffters Handbuch Bd. II/1, S. 430. (1920). — [4] Sohma, T.: Ber. Physiol. 88, 666 (1935). — [5] Heinekamp, W. E. R.: J. Labor. clin. Invest. 8, 165 (1932).

Bradykardie ist bei verschiedenen Tieren, selbst der gleichen Art, verschieden stark ausgeprägt und auch von verschiedener Dauer. Beim Kaninchen (Abb. 1) geht sie rascher vorüber als bei der Katze (Abb. 2).

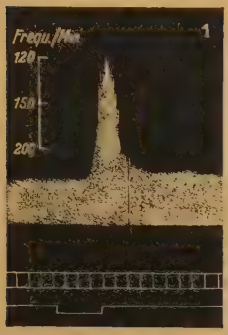


Abb. 1.

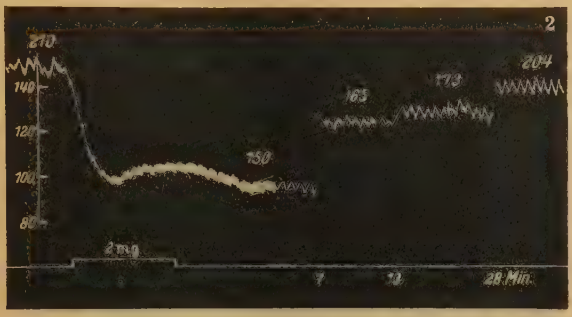


Abb. 2.

Abb. 1. Kaninchen 2200 g; Herzfrequenz registriert mit einem Ordinatenschreiber nach FLEISCH, der durch die R-Zacke des Ekg gesteuert wurde; Zeit 6 Sek.; beim Zeichen 5 mg Apomorphin intravenös.

Abb. 2. Katze 1700 g; Blutdruck in der Karotis; intravenöse Injektion von 2 mg Apomorphin.

Nach der Durchschneidung der Vagi oder Atropin fällt die Pulsverlangsamung aus, die Blutdrucksenkung kommt jedoch unverändert zustande (Abb. 3).

Die Bradykardie ist als Folge einer direkten Erregung der herzhemmenden Zentren zu betrachten, denn sie tritt auch nach Entnervung des

Abb. 3. Katze 1500 g; Vagi durchschnitten; 6 mg Apomorphin.

Karotissinus und, wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei der intravenösen Injektion, nach dem Einbringen von Apomorphin in den vierten Ventrikel auf (Abb. 7).

Blutdruck.

Der arterielle Druck stürzt nach der intravenösen Injektion schon kleiner Mengen (1—2 mg) steil ab und erholt sich innerhalb der nächsten

30—45 Sek. mehr oder minder (Abb. 2, 3 und 4), um danach ein zweites Mal abzusinken (Abb. 2 und 3) oder sich gleichmäßig auf eine mittlere Höhe einzustellen (Abb. 4). Hierauf beginnt der Druck langsam zu steigen und erreicht nach 15—40 Min. den Ausgangswert.

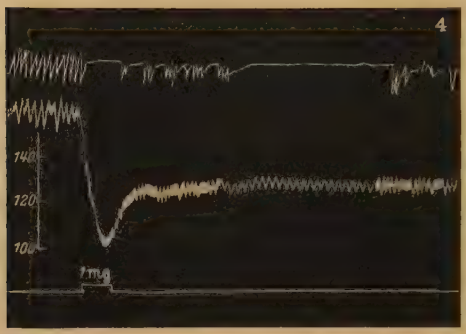


Abb. 4. Katze 2400 g; oben Atmung, unten Blutdruck; 1 mg Apomorphin.

Der venöse Druck, der in der V. cava sup. von der Jugularis aus gemessen wurde, fällt parallel dem arteriellen Druck, und zwar auch, wenn es zu einer beträchtlichen Pulsverlangsamung kommt.

Periphere Gefäßwirkung.

Der Verlauf der Blutdruckkurve ließ daran denken, daß zwei drucksenkende Mechanismen in Tätigkeit treten; insbesondere wies die starke und rasche initiale Senkung des arteriellen sowie des venösen Druckes auf eine periphere Komponente hin.

Versuche am spinalen Tier. Zur Entscheidung der Frage wurden Versuche an dekapitierten Katzen und an Kaninchen nach Durchschneidung des Halsmarkes angestellt. In der Tat kam es auch in diesen Versuchen zu raschen und kräftigen Blutdrucksenkungen, die allerdings nach 1—2 Min. wieder ausgeglichen zu sein pflegten (Abb. 5); sie waren besonders eindrucksvoll, wenn der arterielle Druck durch eine Dauerinfusion von Adrenalin oder eine Injektion von Veritol gehoben worden war. Nach diesen Befunden kann es keinem Zweifel unterliegen, daß beim intakten Tier eine periphere Gefäßwirkung den initialen Drucksturz bedingt oder bei seinem Zustandekommen mitwirkt.

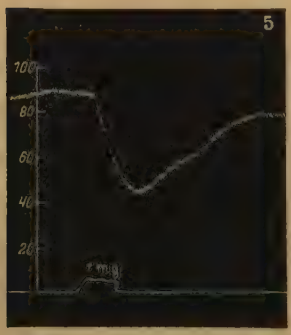


Abb. 5. Das gleiche Tier wie Abb. 4, aber nach der Dekapitierung; 1 mg Apomorphin.

Versuche am Froschgefäßpräparat. Am Trendelenburgschen Präparat hebt Apomorphin die Wirkung von Adrenalin auf (Abb. 6). Da das Apomorphin gleich anderen Brechmitteln nach Harnack[6] eine lähmende Wirkung auf den Herz- und Skelettmuskel besitzt und Emetin nach Pick und Wasicky[7] die Muskulatur des Froschgefäßpräparates lähmt, prüften wir die Wirkung des Apomorphins auf die durch Barium und Digitoxin verengten Gefäße;

[6] Harnack, E.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **2**, 254 (1874); **3**, 44 (1874). — [7] Pick, E. P. u. R. Wasicky: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **80**, 147 (1916).

hier war jedoch Apomorphin unwirksam (Abb. 6). Das Apomorphin verhält sich also ähnlich wie Atropin, das nach HILDEBRANDT[8] an den Gefäßen des Frosches wohl Adrenalin, nicht aber Barium antagonisiert.

Diese Befunde schienen auf eine gewisse sympatholytische Wirkung des Apomorphins hinzuweisen, und daran konnte um so mehr gedacht werden, als auch Ergotamin Erbrechen, Müdigkeit, Schlaf und kollapsähnliche Zustände hervorruft (HESS[9], NORDENFELDT[10]). Die Prüfung war jedoch vollständig negativ; Apomorphin beeinflußte weder die Reaktion der Nickhaut der Katze auf Adrenalin oder die elektrische Reizung des

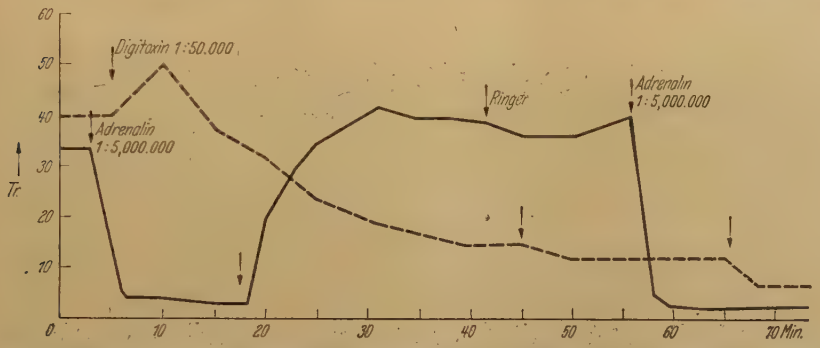


Abb. 6. Froschgefäßpräparat, Einfluß des Apomorphins auf die Wirkung von Adrenalin und Digitoxin. Beim ↓ 1 ccm Apomorphin 1 : 1000.

Halssympathikus, noch die hemmende Wirkung des Adrenalins auf den isolierten Darm des Kaninchens. Danach muß die Frage nach dem Angriffspunkt des Apomorphins an den Gefäßen noch offenbleiben.

Wirkung auf die Kreislaufzentren.

Wie bereits erwähnt, zeigen die Blutdruckkurven nach der intravenösen Injektion von Apomorphin deutlich einen zweiphasigen Verlauf. Die erste steile Phase ist durch die periphere Wirkung ausreichend erklärbar, aber nicht die zweite bis zu 40 Min. anhaltende, da die periphere Wirkung nach Ausweis der Versuche am spinalen Tier nur flüchtig ist.

Es mußte daher an eine zentrale Wirkung gedacht werden; bei der Prüfung dieser Möglichkeit konnte zunächst ein reflektorisches Zustandekommen ausgeschlossen werden, denn es trat die protrahierte Wirkung auch noch nach der Entnervung des Karotissinus und Durchschneidung der Aortennerven sowie der Vagi auf.

Hingegen zeigten sich entsprechende Erscheinungen nach dem Einbringen von Apomorphin in den vierten Ventrikel. Bei diesen Versuchen

[8] HILDEBRANDT, E.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **86**, 225 (1920). — [9] HESS, W. R.: Schweiz. Arch. Neur. **15**, H. 2 (1924); **16**, H. 1 u. 2 (1925). — [10] NORDENFELDT, O.: Z. Kreisl.forsch. **31**, 761 (1939).

wurde die Membrana atlanto-occipitalis der in Bauchlage befestigten Tiere gespalten und das Apomorphin in einem Volumen von 0,1 ccm und in Mengen von 0,1—1,0 mg mit Hilfe eines Ureterenkatheters, der $^1/_2$ cm weit in den vierten Ventrikel vorgeschoben wurde, injiziert. Wie die Abb. 7 zeigt, fällt der Blutdruck unmittelbar nach der Injektion ab, um danach nur langsam im Verlauf von etwa einer halben Stunde zum Ausgangswert zurückzukehren. Gleichzeitig wird der Puls langsamer.

Obzwar das Einbringen von Stoffen in den vierten Ventrikel keine verläßliche Methode ist, um Giftwirkungen zu lokalisieren, da sich nicht überblicken läßt, wohin überall der eingebrachte Stoff gelangt, möchten

Abb. 7. Kaninchen 2100 g; Injektion von 1 mg Apomorphin in den vierten Ventrikel.

wir doch die Beobachtung als Beweis für eine unmittelbare Erregung der kreislaufhemmenden Zentren betrachten und führen zugunsten dieser Auffassung folgendes an: 1. Daß oft schon kleine Mengen wie 0,1 mg kräftig wirken; 2. daß es kaum angängig ist, den steilen Drucksturz auf eine periphere Wirkung nach der Resorption des Apomorphins durch die Meningen zu beziehen, denn nach der intramuskulären Injektion, bei der doch gewiß die Resorptionsbedingungen günstig sind, fällt der Blutdruck nur langsam, selbst wenn man so große Mengen wie 20 mg injiziert; auch sind intramuskulär gegebene Mengen von der Größenordnung, wie sie vom vierten Ventrikel aus wirken, auf den Blutdruck ohne Einfluß; 3. daß eine Lähmung des Vasomotorenzentrums als Ursache der Drucksenkung gleichfalls nicht in Frage kommt, weil die Atmung unbeeinflußt bleibt und auch die Pulsverlangsamung nicht durch eine Lähmung der Akzeleranszentren, sondern durch eine Vaguserregung bedingt ist; allerdings erlebten wir einmal nach der Injektion von 1 mg Apomorphin in den vierten Ventrikel bei der Katze einen Lähmungszustand, wie man ihn nach der Ausschaltung der Oblongata durch Novocain zu sehen bekommt; 4. daß in dem umfangreichen Schrifttum über die Injektion der verschiedensten Substanzen in den vierten Ventrikel fast ausnahmslos über

Blutdrucksteigerungen berichtet wird[11], was darauf hinweist, daß unspezifische Erregungen an dieser Stelle pressorisch wirken.

Veränderungen der Atmung.

Unmittelbar nach der intravenösen Injektion von Apomorphin kommt es zu einer Hemmung der Atmung (Abb. 4). Es treten kurze Stillstände auf, die Exkursionen werden kleiner und das Minutenvolumen ist vermindert. Diese Atmungshemmung dauert höchstens 1 Min. und ist nur bei der ersten Injektion zu beobachten. Nach wiederholten Injektionen wird die Atmung infolge der bekannten erregenden Wirkung des Apomorphins besonders beim Kaninchen immer stärker.

Besprechung der Ergebnisse.

Das Auftreten so starker Kreislaufänderungen nach der intravenösen Injektion von Apomorphin ohne Beteiligung des Brechvorganges war eine Überraschung, denn von einer derart kräftigen Wirkung, insonderheit einer peripheren Komponente, war bisher nichts bekannt. Wir haben nun unsere Beobachtungen dem bisher über die Kreislaufwirkung des Apomorphins Bekannten gegenüberzustellen.

Pulsfrequenz. Während der Nausea kommt es bei Mensch und Tier zu einer Pulsbeschleunigung[1,2]. Harnack[6] nahm eine Erregung der Akzeleranszentren an, und Ehlich und Wällisch[2] brachten diese mit der erhöhten Tätigkeit des Sympathikus zusammen, die während der Nausea den Pylorusschluß hervorruft und wohl auch in der Pupillenerweiterung[12] zum Ausdruck kommt. Dem entspricht nun, daß wir in unseren Versuchen, in denen das Erbrechen ausblieb, nie eine Beschleunigung des Herzschlages, sondern nur Verlangsamungen beobachteten, die auf Erregung des Vaguszentrums bezogen werden mußten. Ähnliche Bradykardien wurden, wie bereits erwähnt, von Heinekamp[5] sowie von Houssay und Hug[13] nach der Injektion von Apomorphin in die Zirkulation des isolierten Hundekopfes beobachtet. — Auch beim Menschen kommt es kurz vor oder bald nach den ersten Brechanfällen zu einer mitunter hochgradigen Bradykardie[1,2] oder es fällt die während der Nausea erhöhte Frequenz zum Ausgangswert ab. Da auch das reflektorische Erbrechen und die schwere Seekrankheit mitunter mit einer Pulsverlangsamung einhergeht — Miller[14] sah den Puls auch nach der Reizung der brechenerregenden Magennerven der Katze langsamer werden —, entstand die Frage, ob die Apomorphinbradykardie als Irradiationserscheinung dem Brechvorgang zuzuordnen ist oder als selbständige Reizwirkung des Apomorphins auf das Vaguszentrum gewertet

[11] Richter, H. u. H. Thoma: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **193**, 622 (1939). — [12] Bertolini, W. u. A. Jarisch: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **203**, 93 (1944). — [13] Houssay, A. u. E. Hug: C. r. Soc. Biol. **99**, 1509 (1928). — [14] Miller, F. R.: Amer. J. Physiol. **37**, 240 (1915); — Pflügers Arch. **143**, 1, 21 (1911).

werden soll. Ehlich und Wällisch[2] neigten der ersten Auffassung zu; unsere Befunde rücken indessen eine direkte Wirkung in den Vordergrund.

Blutdruck. Ähnliche Schwierigkeiten ergeben sich auch für die Beurteilung der Blutdrucksenkung bei den Apomorphinkollapsen des Menschen, denn einerseits sinkt auch beim reflektorischen Erbrechen der Blutdruck[1] und andererseits beweisen unsere Beobachtungen eine selbständige, vom Brechvorgang unabhängige blutdrucksenkende Wirkung des Apomorphins. Diese ist nach Ausweis der Tierversuche durchaus nicht zu unterschätzen, und es fragt sich, wieweit sie bei den Apomorphinkollapsen des Menschen nach den üblichen 10 mg Apomorphin subcutan eine Rolle spielt. Die Frage ist offenbar quantitativer Natur; zu ihrer Entscheidung injizierten wir bei Kaninchen Apomorphin intramuskulär und konnten feststellen, daß diejenige Menge, die eben eine selbständige Blutdruckwirkung hat, bei intramuskulärer Injektion und auf das Körpergewicht umgerechnet etwa dem Doppelten der beim Menschen gebräuchlichen Mengen entspricht. Danach ist es wenig wahrscheinlich, daß die selbständige Apomorphinwirkung bei den Kollapsen des Menschen eine Rolle spielt, sofern nicht so große Mengen wie gelegentlich zur Beendigung von Anfällen von paroxysmaler Tachykardie verabreicht werden.

Unsere Versuche führten zu dem Schluß, daß das Apomorphin die Hemmungszentren für Herz und Gefäße gleichzeitig zu erregen vermag, was bedeutet, daß die gleichen zentralen Einrichtungen in Tätigkeit treten wie bei den Kreislaufentlastungsreflexen; damit stimmt nun auch überein, daß die intravenöse Injektion von Apomorphin eine Hemmung der Atmung zur Folge hat, wie sie bei den Kreislaufentlastungsreflexen beobachtet wird, obzwar das Apomorphin sonst zu den stärksten Erregungsmitteln für die Atmung zählt (Schrifttum bei Lieser[15]); diese Erregung kam in unseren Versuchen erst später zum Vorschein. Man muß sich also vorstellen, daß bei der Erregung der Kreislaufhemmungsapparate nach der stoßartig wirkenden intravenösen Zufuhr von Apomorphin die Hemmung genau so auf die Atmung überspringt wie bei einem plötzlich einsetzenden Entlastungsreflex[16].

Daß das Apomorphin die Hemmungszentren für den Kreislauf erregen und damit so wirken soll wie eine Reizung des Karotissinusnerven, des Aortennerven oder der Bezold-Effekt, ist grundsätzlich bemerkenswert, denn wir kennen wohl Stoffe, die das Herzhemmungszentrum unmittelbar erregen wie das Morphin[17] und vermutlich die Krampfgifte, aber keines, das den Komplex der Hemmungseinrichtungen für Herz und Gefäße

[15] Liesir, H.: Zur Pharmakologie des Apomorphins. Diss. Innsbruck, 1943. — [16] Heymans, C., J. J. Bouckaert u. P. Regniers: Le Sinus carotidien. Paris 1933. — Jarisch, A., u. H. Richter: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **193**, 347 (1939). — [17] Heymans, C., J. J. Bouckaert u. P. Regniers: Arch. internat. Pharmacodynam. **41**, 261 (1931).

gemeinsam erregt. Genau besehen ist aber eine derartige Wirkung gar nicht so überraschend, denn die Apomorphinwirkung entspricht ja einem Bündel vagischer Erregungssymptome, deren am meisten beachtetes nur das Erbrechen ist. Erbrechen, Pulsverlangsamung, Blutdrucksenkung, psychische Hemmung mit Schlafneigung, Tonusverlust der Muskulatur mit Abschwächung der Reflexe, Verminderung des Stoffwechsels und Senkung der Körpertemperatur sind vagische Erscheinungen, und man findet dieses Muster von Symptomen nicht nur bei der Apomorphinwirkung[18], sondern auch mehr oder minder vollständig bei den Kreislaufentlastungsreflexen sowie bei der gewöhnlichen Ohnmacht, namentlich wenn sie in Form der „vagovasalen Synkope" auftritt (SEIDEL[19]). Danach ist es nicht gerechtfertigt, die Teilerscheinungen der Apomorphinwirkung auseinanderzureißen, um so weniger, als die systematische Abtastung des Zwischenhirns und der Oblongata mit Reizelektroden durch W. R. HESS, MONNIER u. a.[20] zeigte, daß die Reizpunkte, von denen aus der Apomorphinwirkung bzw. dem Kreislaufentlastungssyndrome entsprechende Teilerscheinungen ausgelöst werden können, benachbart liegen und Beziehungen zum Vaguskern aufweisen. So beschrieb HESS[21] erst vor kurzem eine hypothalamische Adynamie bei der Reizung von Punkten in der Nachbarschaft von Bezirken, deren Erregung zur Blutdrucksenkung führt. W. R. HESS verweist auch auf die von KOCH[22] aufgefundene Koppelung von Kreislaufentlastungsreflexen und Muskeltonus, die für die Aufhellung der Zusammenhänge so wichtig ist.

Es wird daher am richtigsten sein, wenn man sagt, das Apomorphin errege den parasympathischen Zentralapparat schlechthin. Daß dabei vom Brechzentrum ausgehende Irradiationen, wie sie auch beim reflektorischen Erbrechen vorkommen, auftreten und dann durch Summation und Bahnung besonders stark werden, darf wohl angenommen werden. Damit verliert aber die oben aufgeworfene Frage, ob die Begleiterscheinungen der Apomorphinwirkung irradiativ vom Brechzentrum aus oder durch unmittelbare Erregung zustande kommen, an Bedeutung, und man versteht auch, daß die vom reflektorischen Erbrechen her bekannten Begleiterscheinungen des Brechaktes, wie Tonusverlust und Adynamie, aber auch die Kreislaufhemmungen nach Apomorphin so hochgradig werden können.

[18] GOWIN, H. J.: Z. Kreisl.forsch. **35**, 226 (1943). — WOTHE, K.: Z. Kreisl.forsch. **35**, 235 (1943). — GSELL, M.: Z. Kreisl.forsch. **35**, 239 (1943). — BERTOLINI, W. u. A. JARISCH[12]. — [19] SEIDEL, H.: Dtsch. Z. Nervenhk. (im Druck). — [20] HESS, W. R.: Das Zwischenhirn und die Regulation von Kreislauf und Atmung. Leipzig 1938. — Pflügers Arch. **243**, 409 (1940). — MONNIER, M.: Schweiz. Arch. Neur. **48**, 272 (1941). — RANSON, G. W. u. P. R. BILLINGSLEY: J. Physiol. (Brit.) **41**, 85 (1916). — SCOTT, J. M. u. F. ROBERTS: J. Physiol. (Brit.) **58**, 168 (1923). — ROBERTS, F.: J. Physiol. (Brit.) **59**, 443 (1925). — [21] HESS, W. R.: Helvet. physiol. Acta **2**, 137 (1944). — [22] KOCH, E.: Z. Kreisl.forsch. **24**, 251 (1932). — Klin. Wschr. **1932 I**, 225.

Modifizierend wirkt auf den Apomorphineffekt beim Menschen das Dazwischentreten von Sympathikuserscheinungen, die daher kommen, daß entsprechend der von W. R. Hess[23] eingeführten Betrachtungsweise in das Funktionsziel des Brechaktes auch sympathisch betriebene Leistungen eingebaut sind, nämlich der Pylorusschluß und die „ergotrope" Betätigung der Skelettmuskulatur bei den Brechbewegungen. Daraus erklärt sich jener Wechsel in der vegetativen Tonuslage, der beim Ablauf der Apomorphinwirkung das Auf und Nieder von Blutdruck, Pulsfrequenz, Pupillenweite, Allgemeinbefinden und Reflexerregbarkeit bedingt.

Zusammenfassung.

Das Apomorphin beeinflußt den Kreislauf auch unmittelbar, d. h. unabhängig vom Brechakt; es erregt den ganzen parasympathischen Zentralapparat und damit auch die Zentren für die Hemmung des Herzens und der Gefäße.

Außerdem besitzt das Apomorphin noch eine peripher gefäßerweiternde Wirkung; am Froschgefäßpräparat hebt es die Wirkung von Adrenalin, nicht aber von Barium und Digitoxin auf.

[23] Hess, W. R.: Schweiz. med. Jb. **1942**, 51.

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut (Prof. Dr. P. Holtz) und dem Pharmakologischen Institut der Universität Rostock (i. V. Prof. Dr. med. P. Holtz).

Über die Beeinflussung der Diurese durch Oxytyramin und andere sympathicomimetische Amine.

Von

Peter Holtz, Karl Credner und Fritz Heepe.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 25. Mai 1944.)

In Untersuchungen über die enzymatische Entstehung von Oxytyramin aus Dioxyphenylalanin (Dopa) hatten sich Anhaltspunkte dafür ergeben, daß das Amin als vermutlich wichtige Adrenalinvorstufe regelmäßig im intermediären Stoffwechsel gebildet und, soweit es nicht der Hormonbildung dient, in den Harn ausgeschieden wird[1]. Die Eliminierung überschüssiger Anteile durch Ausscheidung wurde als Entgiftungsmechanismus aufgefaßt, der den Körper vor der Anhäufung und vor den pharmakologischen Wirkungen der adrenalinähnlichen Substanz schützen soll, und anderen Entgiftungsmöglichkeiten, vor allem dem oxydativen Abbau zu unwirksamen Produkten, an die Seite zu stellen war. Es wurde auf Beziehungen zu dem Krankheitsbild der renalen Hypertonie hingewiesen, die sich durch ein Versagen dieser Entgiftungsmechanismen ergeben würden.

Die *Niere* ist das an Dopadecarboxylase reichste Organ des Körpers[2]. Als *Ausscheidungsorgan* wird sie damit gleichzeitig zur *Hauptproduktionsstätte* für Oxytyramin. Schon diese Gesichtspunkte legten es nahe, sich über die Wirkung des Amins auf die wichtigste Funktion der Niere, die Harnbereitung, zu orientieren. Wir haben zunächst den Einfluß von Oxytyramin auf die Wasserdiurese untersucht und zum Vergleich dann auch andere sympathicomimetische Amine in den Kreis der Untersuchungen einbezogen.

1. Meerschweinchenversuche.

Zu Diureseversuchen an kleinen Laboratoriumstieren werden im allgemeinen Ratten und Mäuse benutzt. Wir haben auch Versuche mit Meerschweinchen gemacht, da diese Tierart sich in früheren Untersuchungen als besonders reich an Dopadecarboxylase, dem oxytyraminbildenden

[1] Holtz, P. u. K. Credner: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **200**, 356 (1942). — [2] Holtz, P., R. Heise u. K. Lüdtke: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **191**, 87 (1938). Holtz, P. u. K. Credner: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **199**, 145 (1942).

Ferment, erwiesen hatte und deshalb für Versuchstiere mit Oxytyramin und vor allem mit Dopa, der Muttersubstanz des Amins, geeignet erschien.

Methodik. Die Hauptschwierigkeit besteht darin, eine gleichmäßige Wässerung der Tiere zu erreichen. Nach zahlreichen Vorversuchen fanden wir die folgende Methode als die geeignetste. Männliche Tiere von 300—500 g Gewicht werden mindestens 3 Tage lang vor dem Versuch mit gekochten Kartoffeln und Hafer ernährt. Wasser ad libitum. — Am Vorabend des Versuchs erhalten die Tiere 4 ccm pro 100 g destilliertes Wasser mit der Schlundsonde („Vorwässerung") und bleiben dann nüchtern. Am nächsten Morgen erfolgt die „Hauptwässerung" mit 5 ccm/100 g dest. Wasser peroral, anschließend wird das zu untersuchende Amin in höchstens 1 ccm physiologischer NaCl-Lösung intramuskulär injiziert. Die Tiere befinden sich einzeln in Diuresekäfigen. Der sezernierte Harn wird halb- bis einstündlich gemessen. Die Harnmengen werden in Prozent der verabfolgten Wassermenge ausgedrückt.

Sämtliche Tiere sind, bevor sie zum Versuch genommen werden, einem „Leerversuch" mit Vor- und Hauptwässerung unterworfen worden; nur solche, deren Harnmengen nicht mehr als 10% von den Durchschnittswerten (siehe weiter unten) abwichen, wurden benutzt. Ungefähr 20% unseres Tiermaterials mußte ausgeschaltet werden, da es den gestellten Anforderungen nicht genügte. Trotz der Vorprüfung enthielt jeder Versuchsansatz 1—2 Kontrolltiere, denen nur Wasser verabfolgt wurde.

Die einzelnen Tiere wurden nicht öfter als einmal wöchentlich zum Versuch genommen, da eine häufigere Beanspruchung zu hohe Ausfälle durch Tod verursachte. Auch so überlebten die meisten Tiere — im Gegensatz zu den widerstandsfähigeren Ratten — nicht mehr als 4—5 Versuche.

Im Durchschnitt von 80 Versuchen schieden unsere Versuchstiere im Leerversuch — 5 ccm Wasser/100 g — folgende Harnmengen in Prozent der zugeführten Wassermenge aus:

Nach 1 Std.	2 Std.	3 Std.	4 Std.	8 Std.
29%	71%	93%	102%	114%

Oxytyramin.

Die mit Sicherheit wirksamen Dosierungen beginnen mit 10 mg/kg. Die in Versuchen mit 10—50 mg/kg regelmäßig auftretende charakteristische Wirkung besteht in einer vollkommenen *Sekretionssperre* (Abb. 1). Die Dauer der Sekretionssperre — 1—$1^1/_2$ Stunden — läßt innerhalb des wirksamen Dosierungsbereiches keine Abhängigkeit von der injizierten Aminmenge erkennen, sie differiert von Tier zu Tier unabhängig von der Dosis. — Wir haben uns wiederholt davon überzeugt, daß die Ursache ein Versiegen der Nierensekretion und nicht eine etwa durch Sphinkterkrampf bedingte Hemmung der Blasenentleerung ist Die verzögerte Diurese holt dann im Verlauf des Versuchs auf, erreicht längstens während der 4. Versuchsstunde die Werte des Kontrollversuchs (Abb. 1) und liegt nach 8 Stunden meistens sogar etwas höher als diese (Tabelle 1).

In Versuchen mit *kleineren* Oxytyraminmengen zeigten 7 von 28 Tieren auch schon nach 5 mg/kg den typischen Effekt der Diuresehemmung, bei den übrigen war diese Dosis wirkungslos.

Die Hemmungswirkung erstreckt sich auch auf die *Purinkörperdiurese*, wie aus der Abb. 2 hervorgeht.

Tabelle 1. *Meerschweinchendiurese in Prozent der verabfolgten Wassermenge.*

Zeit	60 Min.	120 Min.	180 Min.	240 Min.	480 Min.	Mittel aus
Kontrollen	33	75	91	96	112	24 Versuchen
10 mg/kg Oxytyramin	—	43	85	97	120	8 „
20 mg/kg Oxytyramin	—	50	88	102	124	16 „
250 γ/kg Adrenalin	45	84	104	110	130	4 „
500 γ/kg Adrenalin	78	136	160	172	193	18 „
Kontrollen	22	70	94	98	110	20 „
50 mg/kg Tyramin	26	72	82	88	114	10 „
100 mg/kg Tyramin	39	56	70	70	95	6 „
250 γ/kg Arterenol	53	92	100	117	128	8 „
500 γ/kg Arterenol	82	115	120	132	146	10 „

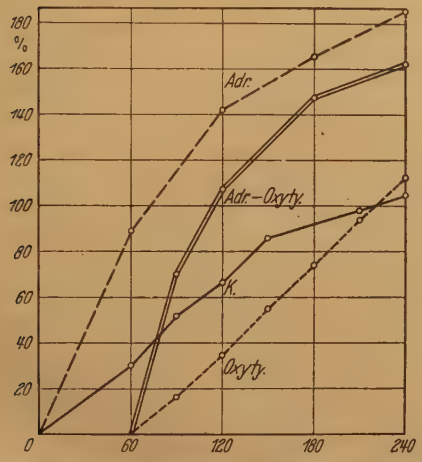


Abb. 1. Meerschweinchendiurese. Oxytyramin und Adrenalin. *K.* Kontrolle, *Oxyty.* 20 mg/kg Oxytyramin i.m., *Adr.* 500 γ/kg Adrenalin i.m., *Adr.-Oxyty.* 500 γ/kg Adrenalin + 20 mg/kg Oxytyramin i.m.

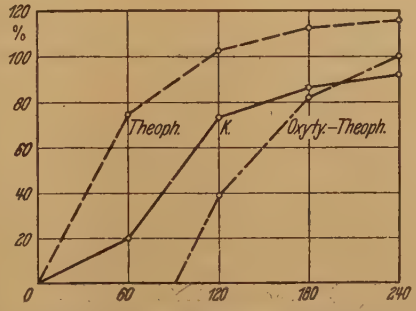


Abb. 2. Meerschweinchendiurese. Theophyllin + Oxytyramin. *K.* Kontrolle, *Theoph.* 10 mg/kg Theophyllin. natriosalicyl. i.m., *Oxyty.-Theoph.* 20 mg/kg Oxytyramin + 10 mg/kg Theophyllin. natriosalicyl. i.m.

Dopa.

Dioxyphenylalanin (Dopa), die Muttersubstanz des Oxytyramins im intermediären Stoffwechsel, aus der vor allem in der Niere *selbst* durch Decarboxylierung das Amin gebildet wird, wurde in Dosierungen von 50—200 mg/kg untersucht. Die Schwerlöslichkeit der Aminosäure — höchstens 10 mg in 1 ccm 0,9%iger NaCl-Lösung — erschwert die parenterale Applikation größerer Mengen. In allen Versuchen mit peroraler Verabfolgung, subcutaner, intramuskulärer und intraperitonealer Injektion — wobei den Kontrolltieren die entsprechenden Mengen physiologischer Kochsalzlösung injiziert wurden — war Dopa ohne jede Wirkung. Auf Grund früherer Beobachtungen[1] scheiden Meerschweinchen nach Zufuhr von Dopa in den hier untersuchten Dosierungen *mehr* Oxytyramin in den

Harn aus, als bei intramuskulärer Injektion des Amins zur Erzielung des antidiuretischen Effekts erforderlich wäre. Es wird also sicher mehr als die Wirkdosis *gebildet*. Wenn deshalb Dopa auch bei höchster Dosierung die Diurese unbeeinflußt läßt, so kann die Erklärung wohl nur sein, daß die *Ausscheidung* des enzymatisch entstehenden Amins durch die Niere mit der *Resorption* der Aminosäure und ihrer *Decarboxylierung* Schritt hält und dadurch die für die antidiuretische Wirkung notwendige Konzentration nicht zustande kommen läßt. Diese müßte sich demnach durch Hemmung der Ausscheidung erreichen lassen. So erhält man denn auch mit Dopa deutliche Wirkungen, wenn man zunächst Oxytyramin in einer Dosierung verabfolgt, die erfahrungsgemäß die Harnsekretion um ungefähr 1 Stunde unterbindet, und dann 45 Min. nach Versuchsbeginn — $^1/_4$ Stunde vor der erwarteten Lösung der Sekretionssperre — Dopa injiziert. Das aus der Aminosäure entstehende Amin kann unter diesen Bedingungen kumulieren, so daß beim Abklingen der Wirkung des zuerst injizierten Oxytyramins erneut eine wirksame Aminkonzentration vorliegt und die Sekretionssperre verlängert (Abb. 3).

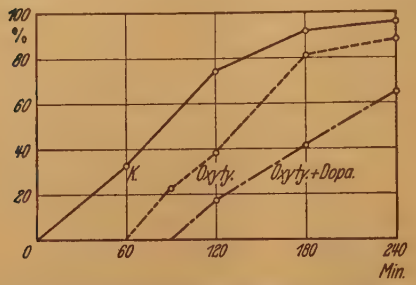


Abb. 3. Meerschweinchendiurese. Oxytyramin und Dopa. *K.* Kontrolle, *Oxyty.* 10 mg/kg Oxytyramin, *Oxyty-Dopa.* 10 mg/kg Oxytyramin, 45 Min. später 40 mg/kg Dopa i.m. (Mittelwerte aus je drei gleichzeitigen Versuchen.)

Adrenalin.

Die Wirkung des Adrenalins auf die Meerschweinchendiurese ist derjenigen des Oxytyramins gerade entgegengesetzt. Dosierungen unter 250 γ/kg sind meistens unwirksam. Größere Mengen führen ausnahmslos zu einer mehr oder weniger starken Diurese*förderung*, deren Ausmaß innerhalb bestimmter Grenzen mit steigender Dosis zunimmt. — Nach einer gut wirksamen Dosis von z. B. 500 γ/kg setzt die diuretische Wirkung frühzeitig ein, so daß meistens schon zu Beginn der 2. Versuchsstunde fast die gesamte aufgenommene Wassermenge ausgeschieden ist (Abb. 1 und Tabelle 1). Im weiteren Verlauf des Versuchs schießt dann die Diurese beträchtlich über das verabfolgte Wasserquantum hinaus. Die bis zum Ende der 4. Versuchsstunde sezernierten Harnmengen liegen fast doppelt so hoch wie bei den Kontrollen. — Bemerkenswert ist, daß es im Gegensatz zu Oxytyramin auch bei Anwendung sehr hoher Dosen, die gerade noch ohne schwerere Allgemeinerscheinungen vertragen werden — 1 mg/kg verursachte mehrere Male tödliches Lungenödem — nicht möglich ist, mit Adrenalin eine Hemmung der Diurese zu erzielen.

Adrenalin/Oxytyramin. — Adrenalin/Pituitrin.

Die Wirkung des Oxytyramins auf die Diurese, charakterisiert durch eine langdauernde Sekretionssperre, ist der antidiuretischen Wirkung des Hypophysenhinterlappenhormons zum Verwechseln ähnlich (Abb. 4). — Die Frage nach dem Wirkungsmechanismus wird später erörtert. Wir möchten aber schon jetzt darauf hinweisen, daß für die Oxytyramin- und Pituitrinhemmung ein verschiedenartiger Mechanismus anzunehmen ist. Dafür spricht die unterschiedliche Beeinflußbarkeit durch das antagonistisch wirkende Adrenalin. Injiziert man einem Meerschweinchen in die Muskulatur des einen Oberschenkels *Pituitrin*, gleichzeitig in die des anderen *Adrenalin*, so wird der antidiuretische Pituitirneffekt von der diuretischen Wirkung des Adrenalins fast vollständig überdeckt (Abb 4). Der Kurvenverlauf gleicht demjenigen der reinen Adrenalinkurve; von dem für Pituitrin typischen Versiegen der Harnsekretion — im Kontrollversuch von $1^1/_2$stündiger Dauer — ist nichts mehr zu bemerken. Das gleiche Ergebnis hatten Versuche, in denen Pituglandol in zehnfach höherer Dosierung injiziert wurde (1 Voegtlin-Einheit je Kilogramm) — Demgegenüber vermag bei gleichzeitiger Injektion von *Oxytyramin* und *Adrenalin* dieses die durch Oxytyramin verursachte Sekretionssperre nicht zu durchbrechen. Wie vom Kontrolltier, das nur Oxytyramin erhielt, wird auch vom Adrenalin-Oxytyramintier 60 Min. lang kein Tropfen Harn sezerniert (Abb. 1). Dann aber bricht nach Lösung der Sperre die Adrenalinwirkung in Form einer gewaltigen Harnflut durch: Mehr als die gesamte verabfolgte Wassermenge wird jetzt in einer einzigen Stunde ausgeschwemmt, dreimal mehr als von der Oxytyraminkontrolle. Nach weiteren 2 Stunden erreicht die Ausscheidungskurve mit 160% fast die Höhe des Adrenalinkontrollversuchs. Vielleicht noch deutlicher tritt der Antagonismus der beiden Amine in Erscheinung, wenn Oxytyramin *während* der durch Adrenalin hervorgerufenen Diurese injiziert wird. Der steile Anstieg der Ausscheidungskurve wird dann für 1 Stunde unterbrochen (Abb. 5). Das Ergebnis erscheint insofern besonders bemerkenswert und überraschend, als das intramuskulär injizierte Adrenalin noch nach einer einstündigen Latenzperiode fast ungeschmälert

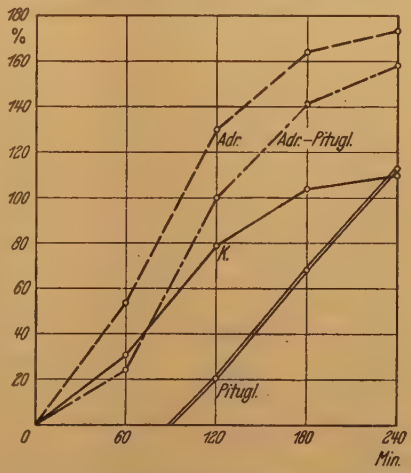
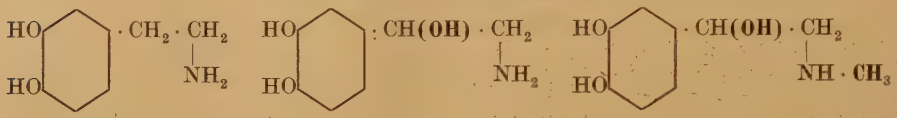


Abb. 4. Meerschweinchendiurese. Adrenalin-Pituglandol. *K.* Kontrolle, *Adr.* 500 γ/kg Adrenalin, *Pitugl.* 0,09 Voegtlin-E/kg Pituglandol, *Adr.-Pitugl.* 500 γ/kg Adrenalin + 0,09 Voegtlin-E Pituglandol.

seine diuretische Wirkung entfaltet zu einem Zeitpunkt, zu dem wohl kaum noch wirksame Substanz im Körper kreisen dürfte. Der Versuch, den *Mechanismus* der diuretischen Wirkung des Adrenalins zu erklären, müßte das berücksichtigen.

Arterenol. — Tyramin.



Oxytyramin — Arterenol — Adrenalin

Dioxyphenyl-äthanolamin (Arterenol, Nor-epinephrin), das chemisch zwischen Oxytyramin und Adrenalin steht, beeinflußt die Meerschweinchendiurese ähnlich wie Adrenalin (Tabelle 1). Die in 4 Stunden sezernierten Harnmengen übersteigen das verabfolgte Wasserquantum beträchtlich, erreichen aber auch nach den höchsten Dosen niemals die Werte der Adrenalinversuche. Andererseits verursacht Arterenol wie Adrenalin niemals eine *Hemmung* der Diurese.

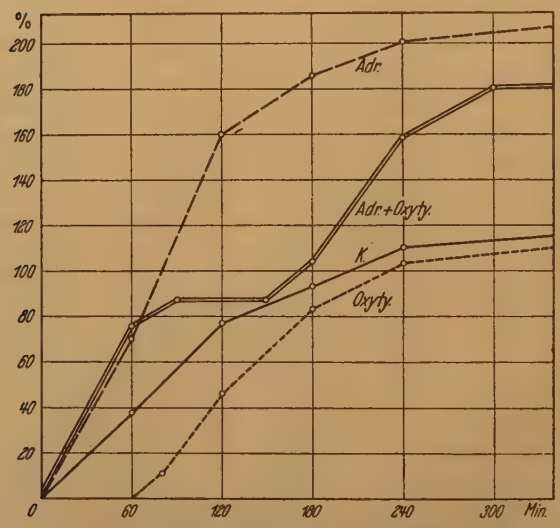


Abb. 5. Meerschweinchendiurese. Adrenalin-Oxytyramin. *K.* Kontrolle, *Adr.* 600 γ/kg Adrenalin, *Oxyty.* 10 mg/kg Oxytyramin, *Adr.* + *Oxyty.* 500 γ/kg Adrenalin, nach 45 Min. 10 mg/kg Oxytyramin.

Tyramin ist bis zu Dosierungen von 50 mg je kg wirkungslos. 100 mg je kg üben eine geringfügige Hemmungswirkung aus, die aber nicht wie beim Oxytyramin als absolute Sekretionssperre, sondern lediglich in Form einer etwas verzögerten Ausscheidung in Erscheinung tritt (Tabelle 1).

Phenyläthylamin. — Isoamylamin.

Die Wirkung dieser beiden Amine stimmt in charakteristischen Merkmalen überein. Beide besitzen in *mittlerer* Dosierung deutlich diuretische Wirkung: Nach 30—50 mg/kg liegen die sezernierten Harnmengen von Anfang an über den Normalwerten, so daß die Diurese meistens schon nach 2 Stunden praktisch beendet ist (Abb. 6). — Für beide Amine ist

charakteristisch, daß die diuretische Wirkung bei *höherer* Dosierung, z. B. nach Injektion von 100 mg/kg kleiner wird und schließlich bei noch massiveren Dosen (150 mg/kg) in eine Hemmungswirkung umschlägt, die sich beim Phenyläthylamin zu einer ausgesprochenen Sekretionssperre steigert, wie sie für die Wirkungsart des Oxytyramins bei weit geringerer Dosierung typisch war. Im Wirkungsbild des Phenyläthylamins fallen dann außerdem *zentrale Erregungen* auf, die regelmäßig nach jeder wirksamen Dosis in Erscheinung treten. Wenige Minuten nach der Injektion werden die Tiere unruhig und schreckhaft, laufen im Kreise herum und sind von ausgeprägter Nagesucht befallen. Nach ungefähr $^1/_2$ Stunde sind die Erregungssymptome abgeklungen.

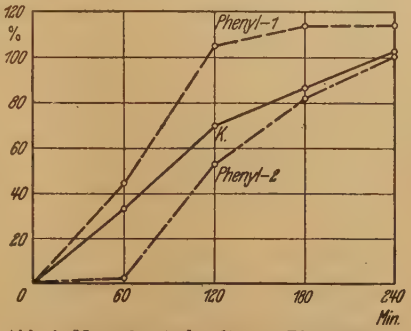


Abb. 6. Meerschweinchendiurese. Phenyläthylamin. *K.* Kontrolle, *Phenyl.-1* 50 mg/kg Phenyläthylamin i.m., *Phenyl.-2* 150 mg/kg Phenyläthylamin i.m.

2. Rattenversuche.

Methodik. 180—200 g schwere weiße Ratten. Die Nahrung bestand aus Brot, Hafer, gekochten Kartoffeln, Magermilch und Fleischresten. Vorwässerung, Hauptwässerung und Amininjektionen wie in den Meerschweinchenversuchen. Je 2 Tiere in einem Diuresekäfig. Die Ratten schieden bei unserer Versuchsanordnung weniger Harn aus als die Meerschweinchen: Nicht 100%, sondern nur ungefähr 75% der verabfolgten Wassermenge in 4 Stunden. Die Ausscheidung betrug im Durchschnitt von 80 Versuchen:

Nach 1 Std.	2 Std.	3 Std.	4 Std.	8 Std.
31%	64%	73%	76%	83%

Oxytyramin. Dopa. Adrenalin.

Im Gegensatz zu seiner antidiuretischen Wirkung in den Meerschweinchenversuchen ist *Oxytyramin* in gleicher Dosierung bei der Ratte von allen untersuchten Aminen das stärkste Diuretikum (Abb. 7, Tabelle 2). Schon während der 1. Versuchsstunde werden 100% mehr Harn ausgeschieden als von den Kontrollen, nach 2 Stunden ist die Oxytyramindiurese beendet, die Harnmengen liegen ungefähr 30% höher als diejenigen der Kontrollversuche am Ende der 4. Versuchsstunde.

Um den *antidiuretischen* Effekt am Meerschweinchen zu erhalten, waren 10 mg Oxytyramin/kg nötig, für den *diuretischen* Effekt an der Ratte genügt schon die halbe Dosis. Das mag erklären, weshalb auch *Dopa*, dessen Wirkung in den *Meerschweinchen*versuchen selbst bei sehr massiver Dosierung sich nur unter besonderen Bedingungen demonstrieren ließ, bei der *Ratte* regelmäßig eine beschleunigte und vermehrte

Tabelle 2. *Rattendiurese in Prozent der verabfolgten Wassermenge.*

Zeit	60 Min.	120 Min.	180 Min.	240 Min.	480 Min.	Mittel aus
Kontrollen	27	58	69	72	76	16 Versuchen
10 mg/kg Oxytyramin .	72,5	94	95	95	99	8 „
500 γ/kg Adrenalin . . .	58	77	86	87	91	8 „
Kontrollen	35,5	73	78	82	90	22 „
50 mg/kg Tyramin . . .	50	91	94	97	105	6 „
100 mg/kg Tyramin . .	20	62	77	79	95	4 „
250 γ/kg Arterenol . . .	51	94	96	96	100	6 „
500 γ/kg Arterenol . . .	66	97	106	106	110	6 „

Ausscheidung veranlaßt, die mit der Wirkung der kleineren Oxytyraminmengen vergleichbar ist (Abb. 7).

Adrenalin wirkt — schwächer als Oxytyramin — diuresefördernd (Abb. 7, Tabelle 2). Niemals kommt es bei der Ratte zu einer auch nur annähernd so starken Mobilisierung von Flüssigkeit über die verabreichte Wassermenge hinaus wie in den Meerschweinchenversuchen.

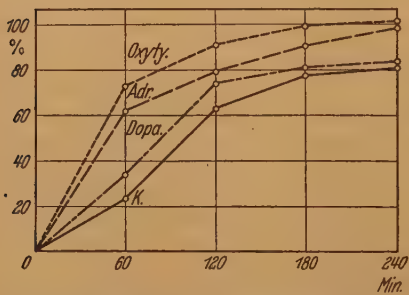


Abb. 7. Rattendiurese. Oxytyramin-Dopa-Adrenalin. *K.* Kontrolle, *Oxyty.* 20 mg/kg Oxytyramin, *Dopa.* 40 mg/kg Dopa, *Adr.* 500 γ/kg Adrenalin.

Arterenol. Tyramin. Phenyläthylamin.

Arterenol ist wirksamer als Adrenalin. Schon 100 γ/kg haben einen diuretischen Effekt, der sich bei höherer Dosierung verstärkt. Auch nach großen Dosen tritt niemals Diuresehemmung auf. Ähnlich wie Arterenol wirkt *Tyramin* (Tabelle 2). — Die Wirkung des *Phenyläthylamins* ist bei Meerschweinchen und Ratte die gleiche: Kleinere und mittlere Dosen — 25—50 mg/kg — *fördern*, große Dosen — 100 mg/kg und mehr — *hemmen* die Diurese.

Wirkungsmechanismus.

Im Vordergrund des pharmakologischen Wirkungsbildes sympathicomimetischer Amine steht die *Herz-* und *Gefäßwirkung*. Zur Erklärung diuretischer Wirkungen wird deshalb zunächst diese Grundwirkung in Betracht zu ziehen sein, zumal die von der Niere geleistete Sekretionsarbeit nach unseren heutigen Kenntnissen weitgehend unabhängig von direkten nervösen Einflüssen auch nach vollkommener Denervierung des Organs noch erfolgt, und andererseits enge Beziehungen zwischen Diurese und Kreislauf bestehen. Die wichtigsten in Frage kommenden Kreislauffaktoren sind die Höhe des Blutdrucks und die Durchblutungsgröße des

Ausscheidungsorgans. Es darf als experimentell gesichert gelten, daß bei Konstantbleiben aller anderen Faktoren die sezernierte Harnmenge eine direkte Funktion des Blutdrucks sein kann, und daß eine Drosselung der Nierendurchblutung eine verminderte Diurese im Gefolge hat.

Die Beurteilung ob und in welcher Art die Gefäßwirksamkeit eines pressorischen, sympathicomimetischen Pharmakons sich auf die Harnsekretion auswirkt, wird dadurch erschwert, daß je nach dem Angriffspunkt der vasokonstriktorischen Wirkung innerhalb des Gefäßsystems direkt entgegengesetzte Beeinflussungen der Nierentätigkeit zu erwarten sind. Beschränkt sich die Gefäßverengerung auf extrarenale Gefäßgebiete, so kann der erhöhte Blutdruck als erhöhter Filtrationsdruck zu einer Steigerung der Diurese führen, wird dagegen auch das Gefäßgebiet der Niere selbst, vielleicht sogar bevorzugt, von der Vasokonstriktion betroffen, so resultiert unter Umständen trotz der Erhöhung des allgemeinen Blutdrucks eine verminderte Diurese, wobei durch eine differenzierte Beeinflussung der Vasa afferentia bzw. efferentia des Glomerulussystems und der die Tubuli versorgenden Kapillaren weitere Modifikationen der Filtrationsleistung im Glomerulus- und der Resorptionsgröße im Tubulussystem möglich sind. Unterschiedliche Ansprechbarkeit der besonders in Frage kommenden Gefäßabschnitte läßt deshalb vielleicht schon von vornherein in Abhängigkeit von Tierart und Dosierung verschiedenartige Wirkungen erwarten.

Berücksichtigt man ferner, daß neben der *Kreislaufwirkung* auch andere Wirkungen, vor allem *Stoffwechselwirkungen* der sympathicomimetischen Amine von Bedeutung für die Diurese werden können, wie z. B. der besonders beim Adrenalin ausgeprägte hyperglykämische Effekt oder Beeinflussungen des Mineralhaushaltes, wie sie beispielsweise in Untersuchungen Biberfelds[3] am Kaninchen als Retention von Chloriden im Anschluß an eine Adrenalininjektion beobachtet wurden, und daß schließlich auch „spezifische" Wirkungen auf die „vitale" Funktion sezernierender oder resorbierender Epithelien der Niere möglich sind, so wird verständlich, daß die bisher in der Literatur niedergelegten Untersuchungsergebnisse und ihre Deutung reich an Widersprüchen sind.

Nach der Injektion von *Adrenalin*, dem am häufigsten untersuchten Amin, beobachteten die meisten Forscher im Tierversuch eine Steigerung der Diurese[4], andere Autoren berichten von einer Diuresehemmung[5], während es in noch anderen Untersuchungen — offenbar in Abhängigkeit von der Dosierung — zunächst zu einer Förderung, anschließend zu einer Hemmung der Harnsekretion kam[6]. — Über die Beeinflussung der Diurese durch *Tyramin*, *Phenyläthylamin* und andere proteinogene Phenylalkylamine ist nur wenig bekannt. Dale und Dixon[7] beobachteten im Selbstversuch nach subcutaner Injektion von Tyramin vermehrten Harndrang, in Versuchen von Enger und Lampas[8] ergab sich nach Zufuhr großer Mengen — bis 3 g — keine Veränderung der Harnmenge; Zipf und Gebauer[9] fanden an der Katze nach

[3] Biberfeld, J.: Pflügers Arch. **119**, 341 (1907). — [4] Pick, E. P. u. F. Pineles: Biochem. Z. **12**, 473 (1908). — Erlandsen, A.: Biochem. Z. **24**, 1 (1910). — Konschegg, A. v.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **70**, 311 (1912). — Sharpe, N. C.: Amer. J. Physiol. **31**, 75 (1912/13). — [5] Elliot, T. R.: J. Physiol. (Brit.) **32**, 401 (1905). — Pollack, L.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **61**, 157 (1909). — Frey, W., W. Bulcke u. P. Wels: Dtsch. Arch. klin. Med. **123**, 163 (1917). — Cushny, A. R. u. G. Lamble: J. Physiol. (Brit.) **55**, 276 (1921). — Arnstein, A. u. F. Redlich: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **97**, 15 (1923). — Springorum, P. W.: Pflügers Arch. **240**, 342 (1938). — [6] Falta, W., L. H. Newburgh u. E. Nobel: Z. klin. Med. **72**, 97 (1911). — [7] Dale, H. H. u. W. Dixon: J. Physiol. (Brit.) **39**, 25 (1909). — [8] Enger, R. u. H. Lampas: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **196**, 171 (1940). — [9] Zipf, K. u. A. Gebauer: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **189**, 257 (1938).

Verabfolgung von Tyramin eine kräftige Diuresesteigerung, nach Abelin[10] wirken Tyramin und Phenyläthylamin an Ratten meistens diuresefördernd. — *Oxytyramin*, *Arterenol* und *Isoamylamin* scheinen noch nicht auf ihre diuretische Wirkung untersucht worden zu sein.

Im folgenden soll versucht werden, die von uns beobachteten *Diuresewirkungen* besonders des *Oxytyramins* und *Adrenalins* auf Grund faßbarer *Kreislaufwirkungen* der beiden Amine zu erklären.

1. Oxytyramin wirkte beim Meerschweinchen diuresehemmend, indem es eine ungefähr einstündige Sekretionssperre hervorrief, an der Ratte diuresefördernd. — Injiziert man einem mit Urethan narkotisierten Meerschweinchen, dessen Blutdruck aus der Karotis registriert wird, eine sicher antidiuretisch wirksame Oxytyraminmenge — 10—20 mg/kg — intramuskulär, so fällt der arterielle Druck in wenigen Minuten auf die Hälfte oder sogar auf ein Drittel ab (Abb. 8B). Die größte Ausgangshöhe, die wir an 4 Tieren beobachteten, betrug 65 mm Hg. Nach Oxytyramin mißt man demnach nur noch 20—30 mm Hg. Die starke Blutdrucksenkung dauert ungefähr 10 Min., aber auch nach 30 Min. liegt das Blutdruckniveau noch um fast 50% tiefer als vor der Injektion und hat selbst nach 60 Min. die anfängliche Höhe noch nicht wieder erreicht. Den kritischen Filtrationsdruck für die Glomeruli der Meerschweinchenniere kennen wir nicht. Lassen wir den für die menschliche Niere angenommenen Wert von ungefähr 45 mm Hg auch für die Meerschweinchenniere gelten, so würde die langanhaltende depressorische Wirkung des Oxytyramins vollauf erklären, weshalb in den Diureseversuchen nach der Injektion von Oxytyramin 1 Stunde lang kein Tropfen Harn sezerniert wird. — Andererseits würde die Blutdruckwirkung des Oxytyramins verständlich machen, daß es bei der *Ratte* ähnlich wie nach Adrenalin zu einer *Förderung* der Diurese kommt. Denn bei der Ratte wirkt Oxytyramin blutdrucksteigernd wie Adrenalin (Abb. 8D). Während jedoch die durch Oxytyramin beim Meerschweinchen verursachte Diuresehemmung durch die Kreislaufwirkung des Amins nicht nur verständlich, sondern wohl auch befriedigend erklärt wird, trifft das, wie aus dem folgenden hervorgeht, bei der Ratte nach der Injektion von Oxytyramin oder auch Adrenalin für die Beziehung Diureseförderung — Blutdrucksteigerung nicht zu. — Die Ursache für die gerade entgegengesetzte Beeinflussung des Blutdrucks bei Meerschweinchen und Ratte durch Oxytyramin liegt, wie wir in einer vorangegangenen Arbeit[1] dargelegt haben, wahrscheinlich daran, daß bei der Ratte wie bei den meisten Tierarten Oxytyramin als solches zur Wirkung gelangt, beim Meerschweinchen hingegen durch den hohen Gehalt der Organe an Aminoxydase schnell und zum großen Teil in den blutdrucksenkenden Dioxyphenylacetaldehyd umgewandelt wird.

2. Adrenalin wirkte beim Meerschweinchen diuresefördernd, indem es die Harnsekretion nicht nur beschleunigte, sondern auch um fast 100% über die

[10] Abelin, J.: Biochem. Z. **129**, 1 (1922).

aufgenommene Wassermenge hinaus erhöhte; bei der Ratte waren die Wirkungen gleichsinnig, aber schwächer. — Die bei Meerschweinchen und Ratte blutdrucksteigernde Wirkung des Adrenalins (Abb. 8A) entspricht der bei

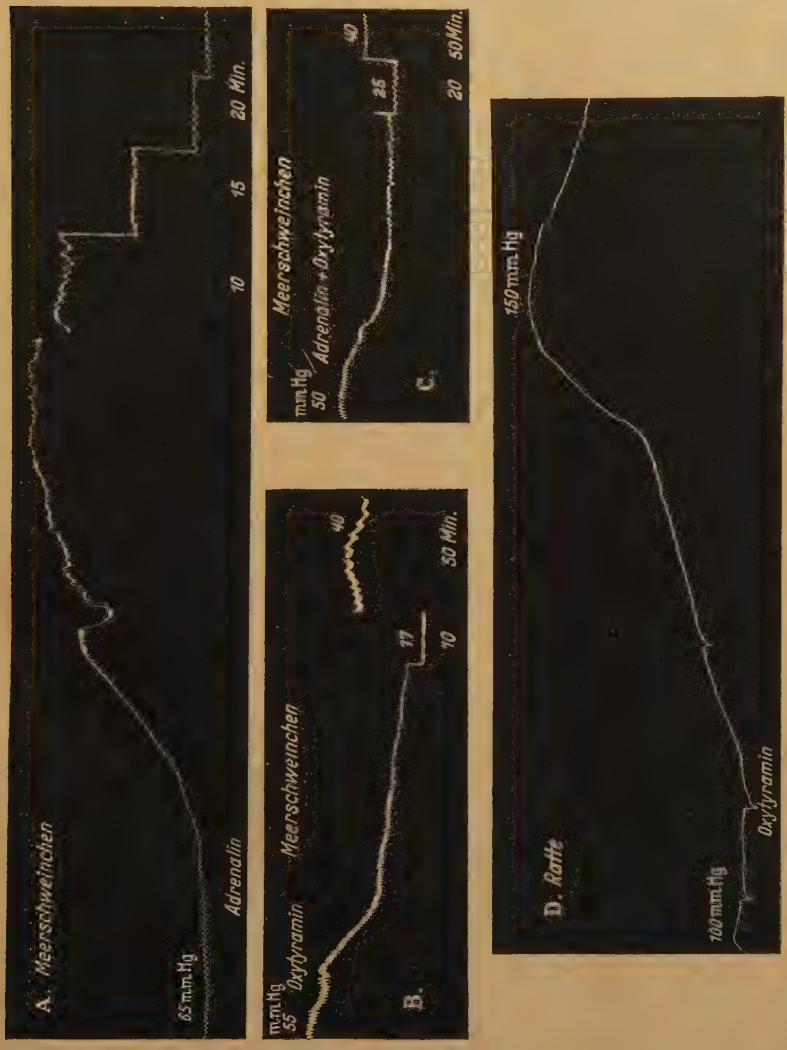


Abb. 8. Blutdruckversuche an Meerschweinchen und Ratten. A. Meerschweinchen, 800 g. *Adrenalin* 500 γ/kg i.m.; B. Meerschweinchen, 600 g. *Oxytyramin* 20 mg/kg i.m.; C. Meerschweinchen, 700 g. *Adrenalin + Oxytyramin* 500 γ/kg Adrenalin + 20 mg/kg Oxytyramin i.m.; D. Ratte, 220 g. *Oxytyramin* 20 mg/kg i.m.

beiden Tierarten prinzipiell gleichartigen Förderwirkung auf die Diurese. Der erhöhte Blutdruck könnte als erhöhter Filtrationsdruck im Glomerulussystem der Niere zur Auswirkung kommen. Wird es aber schon durch das zeitliche Mißverhältnis zwischen der Dauer der Blutdruck- und der Dauer der Diuresewirkung — 20 Min. bzw. mehrere Stunden —, sowie durch die besonders beim Meerschweinchen stark überschießende Sekretion, die

auf die Mobilisierung größerer Flüssigkeitsmengen in den Geweben hinweist, *unwahrscheinlich*, daß die Blutdrucksteigerung einzige Ursache der diuretischen Wirkung ist, so zwingen folgende Erwägungen zur Annahme auch noch anderer ursächlicher Faktoren. Injiziert man einem Meerschweinchen gleichzeitig eine blutdrucksenkende, diuresehemmende Oxytyramin- und eine blutdrucksteigernde, diuresefördernde Adrenalindosis, so erfolgt im *Blutdruckversuch* ein Blutdruckabfall gleichen Grades und gleicher Dauer wie nach Oxytyramin allein (Abb. 8C). Dem entspricht im *Diureseversuch* eine Sekretionssperre wie nach Oxytyramin allein (vgl. Abb. 1). Ist nach ungefähr 1 Stunde die blutdrucksenkende Wirkung des Oxytyramins abgeklungen, so hält sich der Blutdruck auf seiner normalen Ausgangshöhe; das vor 1 Stunde gleichzeitig mit Oxytyramin injizierte Adrenalin macht sich im *Blutdruckversuch* erwartungsgemäß nicht im geringsten mehr bemerkbar, seine pressorische Wirkung ist gewissermaßen unterschlagen worden (Abb. 8C). Demgegenüber bricht im *Diureseversuch*, nachdem hier die durch Oxytyramin verursachte Sekretionssperre abgeklungen ist, die bisher latent gebliebene diuretische Wirkung des vor 1 Stunde injizierten Adrenalins fast unvermindert durch; die trotz der durch Oxytyramin veranlaßten Blutdruckdepression unter dem Einfluß des Adrenalins mobilisierten Flüssigkeitsmengen gelangen nach Aufhebung der Oxytyraminwirkung in einer Harnflut zur Ausscheidung. Die *diuretische* Wirkung des Adrenalins kann deshalb nicht durch die *Kreislauf*wirkung des Hormons verursacht sein, ihr Hauptangriffspunkt scheint vielmehr im Gewebe zu liegen.

Was für Adrenalin gilt, trifft vermutlich mehr oder weniger auch für die anderen pressorisch wirksamen Amine zu. Die im Gegensatz zu Adrenalin und Arterenol beim Tyramin, Phenyläthylamin und Isoamylamin von der Dosierung abhängige Art der Wirkung — Diurese*förderung* durch kleine und mittlere, Diurese*hemmung* durch große Dosen — dürfte ihre Erklärung in einer bei höherer Dosierung stattfindenden Mitbeteiligung der Nierengefäße an der allgemeinen Gefäßkonstriktion oder auch in einer Herzschädigung finden.

Zusammenfassung.

1. *Oxytyramin* verursacht bei *Meerschweinchen* nach Belastung mit 5 ccm/100 g Wasser eine vollkommene Sperre der Harnsekretion von 1—1½stündiger Dauer. Nach Lösung der Sperre holt die Diurese auf und erreicht am Ende der 4. Versuchsstunde die Werte des Kontrollversuchs. Die Hemmungswirkung gleicht derjenigen des antidiuretischen Hypophysenhinterlappenhormons; der Mechanismus beider Wirkungen ist jedoch verschieden. — Bei *Ratten* wirkt *Oxytyramin* diuresefördernd. Der bei beiden Tierarten gerade entgegengesetzten Beeinflussung der Diurese

entspricht eine verschiedenartige Kreislaufwirkung: Oxytyramin wirkt beim Meerschweinchen blutdruck*senkend*, bei der Ratte blutdruck*steigernd*.

2. *Adrenalin* wirkt in jeder Dosierung bei Meerschweinchen und Ratte diuresefördernd. Die in 4 Stunden sezernierten Harnmengen liegen beim Meerschweinchen fast 100%, bei der Ratte ungefähr 30% über dem verabfolgten Wasserquantum. — Die antagonistische *Pituitrin*wirkung läßt bei gleichzeitiger Injektion von Adrenalin und Pituitrin den Adrenalineffekt unbeeinflußt. Demgegenüber kommt in Versuchen mit Meerschweinchen die antidiuretische Wirkung des *Oxytyramins* auch bei gleichzeitiger Injektion von Adrenalin zu voller Ausprägung. Nach ihrem Abklingen bricht dann nachträglich — mit 1—$1^1/_2$stündiger Verzögerung — die diuretische Wirkung des Adrenalins durch. Der Angriffspunkt des Adrenalins dürfte weniger im Gefäßsystem als vielmehr im Gewebe liegen.

3. *Arterenol* wirkt ähnlich wie Adrenalin. *Tyramin* hat bei beiden Tierarten eine nur wenig ausgeprägte Wirkung. Höhere Dosen scheinen eine geringfügige Hemmung zu verursachen. *Phenyläthylamin* und *Isoamylamin* üben bei *niedriger* und *mittlerer* Dosierung eine Förderwirkung, bei *hoher* Dosierung deutliche Hemmungswirkungen aus.

4. Der *Mechanismus* der beobachteten Wirkungen wird zu erklären versucht.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Friedrich-Schiller-Universität Jena.
(Leiter: Prof. Dr. med. et phil. R. Labes.)

Beiträge zum Problem des Wirkungswandels.

I. Mitteilung.

Beobachtungen über inverse Barium- und Papaverinwirkungen an glattmuskeligen Organen.

Von

Dr. med. Leopold Ther, Assistent.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. Juni 1944.)

I. Einleitung.

Die seit alters her übliche Einordnung der Arzneimittel nach funktionellen Wirkungen wurde auch von Buchheim[1] und Schmiedeberg[2] in die Pharmakologie übernommen, um dem Arzt ein verläßliches Kriterium für das therapeutische Handeln zu geben. Die Einordnung wird zumeist nach derjenigen Wirkung vorgenommen, welche bei der Applikation des Mittels am deutlichsten hervortritt. Es hat sich jedoch immer als notwendig erwiesen, nicht nur die deutlich hervortretenden, sondern alle Wirkungen bzw. Wirkungsbedingungen kennenzulernen, um nicht Gefahr zu laufen, mit einem Heilmittel statt der erwünschten eine entgegengesetzte Wirkung zu erzielen.

Die folgenden Mitteilungen sollen einen Beitrag bringen zu der Umkehr pharmakologischer Wirkungen, wie man sie teils in Form zweiphasischer Reaktionen, teils in Form eines echten Wirkungswandels (L. Asher) häufig beobachten kann. Von ihrer ursächlichen Klärung darf ein wichtiger Einblick in das physiologische und pharmakologische Geschehen erwartet werden.

Die Ursachen inverser Wirkungen sind derzeit noch unbekannt. Nach E. Rentz[3] gibt es kaum ein Gift, das unter bestimmten Bedingungen nicht imstande wäre, Phasenwirkungen hervorzurufen. Auf Grund experimenteller Untersuchungen gelangt E. Rentz[3] zu der Vorstellung, daß Gifte durch Ein- und Austritt wellenförmig aufeinanderfolgende, entgegengesetzte Vorgänge als Phasen auslösen. Da es gelungen ist, mit Hilfe kapillaraktiver Stoffe einen Wirkungswandel von neurovegetativen Arzneimitteln herbeizuführen, hat L. Asher[4] die Theorie aufgestellt, daß für die Veränderungen des Reaktionszustandes Grenzflächenspannungsänderungen verantwortlich zu

machen seien, die entweder durch körpereigene, oberflächenaktive Stoffe (z. B. Gallensäuren, Hormone), oder durch kapillaraktive, medikamentöse oder andere Stoffe hervorgerufen werden können. Außer diesen kapillaraktiven Stoffen sind es vor allem Schwermetallionen (Cu, Fe, Au u. a.), welche, wie F. Hazama[5] zeigen konnte, isolierte, glattmuskelige Organe so beeinflussen können, daß eine inverse Adrenalinwirkung nach Vorbehandlung mit diesen Ionen beobachtet wird. Hazama[5] nimmt als Ursache dieses Wirkungswandels einen spezifischen Einfluß des Kupfers bzw. der anderen Metalle an, der wohl eher auf eine chemische als auf eine physikochemische Ursache zurückzuführen ist. Daß jedoch auch Verschiebungen des Ionengleichgewichts mit Grenzflächenspannungsänderungen im Zusammenhang stehen, haben grundlegende Untersuchungen von Langmuir[6] ergeben, der nachgewiesen hat, daß schon geringe Mengen einer Kalziumlösung in Wasser vollständig die Eigenschaften eines Ölfilms verändern können. Die von Langmuir[6] festgestellten Beziehungen zwischen Grenzflächen und Ionen sind für die biologischen Verhältnisse von größter Bedeutung*, da die hydrophobe Phase der biologischen Grenzfläche ja aus Ölen, Fetten, Lipoiden und Eiweißkörpern besteht und somit ebenfalls in ihrem molekularem Aufbau durch die Anwesenheit anorganischer Salze beeinflußt werden kann. Sehr bemerkenswert sind auch die Befunde von Neuschlosz[7], der gezeigt hat, daß Natriumchlorid und Kalziumchlorid für sich allein die Oberflächenspannung einer Lezithinlösung erhöhen, während sie im Gemisch ihre Wirkung auf die Oberflächenspannung aufheben. Dieser kolloidchemische Ionenantagonismus hat durch die Untersuchungen von Labes[8] eine Erklärung gefunden, aus denen hervorgeht, daß Chlorionen die Tendenz haben, die kolloidalen Lezithinteilchen negativ zu laden, während die Kalziumionen in viel stärkerem Maße bestrebt sind, den Lezithinteilchen eine positive Ladung zu erteilen. Der negativierende Ladungseffekt einer physiologischen Kochsalzlösung auf die Lezithinteilchen wird darum durch den Antagonismus eines kleinen Kalziumzusatzes, wie er etwa in der Ringer- oder Tyrodelösung vorliegt, aufgehoben, so daß die Oberflächenspannung wieder ihren ursprünglichen Wert erhält.

Auf welche Weise Verschiebungen des Ionengleichgewichts bzw. Änderungen der Grenzflächenspannung auch Änderungen des Reaktionszustandes bedingen können, ist noch nicht geklärt. Den Pharmakologen ist jedoch seit langem bekannt, daß für eine Wirkungsumkehr Veränderungen des Funktionszustandes in Frage kommen können. Das klassische Beispiel hierfür bietet der Darm, welcher im atonischen Zustand durch Atropin eine Tonuszunahme erfährt (R. Magnus[9]). Da solche Zustandsänderungen bei glattmuskeligen Organen in den meisten Fällen eine Änderung des Tonus oder der rhythmischen Bewegungsleistungen zur Folge haben, so schien es uns angebracht, den Beziehungen zwischen pharmakologischer Wirkung von Arzneimitteln und Funktionszustand glattmuskeliger Organe besondere Aufmerksamkeit zu schenken.

II. Methode.

Die Untersuchung der glattmuskeligen Organe erfolgte nach der Methode von R. Magnus[9] bzw. Magnus-Kehrer[10]. Ein 100 ccm fassendes Gefäß, das sich in einem Thermostaten befand, enthielt 75 ccm Tyrodelösung folgender Zusammen-

* Näheres in der allgemein biologischen und ärztlichen Studie über die physiologische Bedeutung der Zellipoide von R. Degkwitz: Lipoide und Ionen. Leipzig, Theodor Steinkopff, 1933.

setzung: 80 g NaCl, 20 ccm 10%iges KCl, 20 ccm 10%iges $CaCl_2$, 10 ccm 10%iges $MgCl_2$ wurden in 9 Liter destillierten Wassers gelöst (= Tyrode I). 10 g $NaHCO_3$ und 10 ccm 5%iges NaH_2PO_4 wurden in 1 Liter Aqua dest. gelöst (= Tyrode II). Vor jedem Versuch wurde Tyrodelösung aus 9 Teilen Tyrode I und 1 Teil Tyrode II frisch bereitet. Ein am Boden des Gefäßes befindliches Abflußrohr ermöglichte ein rasches Entleeren gebrauchter und Nachfüllen vorgewärmter Tyrodelösung. Die Sauerstoffdurchströmung wurde so eingestellt, daß etwa 100 Sauerstoffperlen pro Minute die Tyrodelösung durchströmten. Die Temperatur wurde durch elektrische Thermoregulierung auf 37° C gehalten. Die Übertragung der Bewegungen des überlebenden Muskels erfolgte mit Hilfe eines Aluminium-Stirnschreibers, der die Exkursionen etwa viermal vergrößert auf die berußte Kymographiontrommel auftrug.

Als Präparate wurden Froschmagenring nach Bernstein, Kaninchendünndarm (Duodenum), Schafuterus, Meerschweinchenuterus und Kaninchenuterus nicht gravider Tiere verwendet. Das Kaninchenduodenum entnahmen wir sofort nach Tötung des Tieres. Ein etwa 5 cm langes Stück wurde nach Ausspülung des Darminhalts an beiden Enden unterbunden und in die Apparatur eingespannt. In verschiedenen Fällen wurde das Präparat einige (2—3) Stunden im Eisschrank bei einer Temperatur von 5° C in Tyrode aufbewahrt. Der den frisch geschlachteten Tieren entnommene Schafuterus wurde in Tyrodelösung vom Schlachthof ins Institut gebracht. Als Präparat haben wir aus dem Horn einen etwa 3 cm langen, 0,3 cm breiten Muskelstreifen herausgeschnitten und durch vorsichtiges Abpräparieren von der Schleimhaut befreit. Vom Meerschweinchenuterus wurde in der Regel ein ganzes Horn als Präparat verwendet, während vom Kaninchenuterus je nach Größe des Uterus ein oder mehrere Präparate hergestellt wurden.

Als Chemikalien wurden Barium chlorat. und Papaverin. hydrochlor. der Jenenser Klinikapotheke verwendet. Die Adrenalinlösung wurde aus Suprarenin „Bayer" frisch bereitet.

III. Mitteilung der Versuchsergebnisse.

A. Versuche über inverse Bariumwirkung.

Das Bariumchlorid gilt seit den Untersuchungen von Boehm[11], Magnus[9], Führer[12] u. a. als ein heftiges Erregungsmittel der glatten Muskulatur, welches in geringen Dosen eine Verstärkung der Spontanbewegungen, in größeren Dosen eine starke Tonuszunahme mit Stillstand der rhythmischen Bewegungen herbeiführt. Diese tonussteigernde Wirkung des Bariums ist ungleich stärker als bei den leichteren Erdalkalimetallen Calcium und Strontium, denen es sonst in der Wirkung auf eiweißartige und lipoide Kolloide, besonders in der Wirkung auf den Ladungs- und Oberflächenspannungszustand des Lezithins, außerordentlich nahesteht (Labes[8]). Man kann daher annehmen, daß die weniger spezifischen Phosphatide der nervösen oder anderer erregbarer Organe in ähnlicher Weise durch diese drei Erdkalimetalle beeinflußt werden. In seiner tonussteigernden Wirkung auf die glatte Muskulatur ist aber das Barium den beiden anderen Erdalkalimetallen stärker überlegen, als seiner kolloidchemischen Beeinflussung des Lezithins entspricht, und wird unter den Kationen nur unter bestimmten Zustandsbedingungen vom Blei erreicht bzw. übertroffen. Beim Blei wären neben kolloidchemischen Erklärungsmöglichkeiten noch die verschiedensten Möglichkeiten der Stoffwechselbeeinflussung denkbar. (Abfangen der Sulfhydrilgruppen und die Bildung zahlreicher anderer Additionsverbindungen mit irgendwelchen, den Stoffwechsel beeinflussenden Bausteinen der Zellen.) Aber auch die meisten derartig bekannten Beeinflussungsmöglichkeiten, die das Blei mit anderen Schwermetallen gemeinsam hat, scheiden deshalb als Ursachen aus, weil die übrigen Schwermetalle derartige Kontrakturen der glatten Muskulatur nicht hervorrufen. Man muß daher

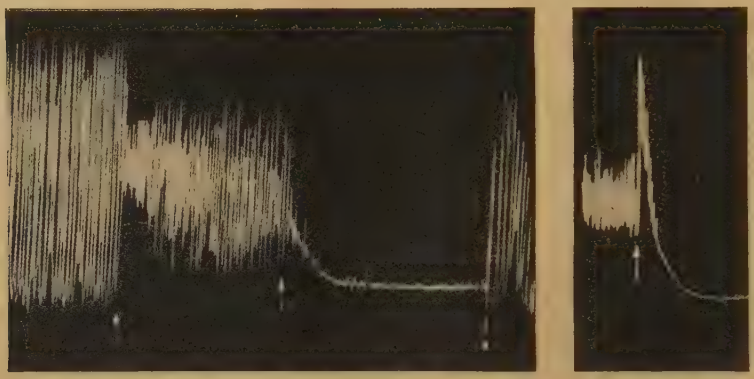
annehmen, daß durch andere Nebenbedingungen derartige Stoffwechseleffekte weitgehend moditiziert werden können. Auffallend ist, daß die beiden Metalle Barium und Blei, welche die Kontraktur der glatten Muskulatur herbeiführen, sich gegenüber anderen Schwermetallen durch eine besondere Affinität zu den Sulfationen auszeichnen. Ob Blei und Barium auch gegenüber organisch gebundenen Schwefelsäurederivaten eine ähnliche Affinität aufweisen, steht noch dahin. Jedenfalls ist der Wirkungsmechanismus der Barium- und Bleikontraktur noch nicht geklärt.

Wie die Wirkung vieler Stoffe, so scheint auch die Bariumwirkung zum Teil von dem Funktionszustand des Organs abhängig zu sein. Senkt man z. B. den Tonus eines Froschmagenpräparates mit Adrenalin oder Zystein, so genügen in vielen Fällen, wie LABES[8] gezeigt hat, wesentlich kleinere Bariumzusätze, um eine sehr erhebliche Tonussteigerung mit häufig nachfolgender starker Pendelbewegung hervorzurufen. Ob bei dieser Sensibilisierung des Froschmagenpräparates für den tonisierenden Bariumeffekt die Beeinflussung gewisser Stoffwechselvorgänge durch Adrenalin bzw. Zystein eine Rolle spielt oder mehr die veränderte Tonuslage, ist noch eine offene Frage. Unter anderen Versuchsbedingungen kann aber die tonisierende Wirkung des Bariums auf die glatte Muskulatur in eine inverse Tonusherabsetzung umschlagen. So fand R. RENTZ[3], daß nach Durchströmung der Froschgefäße mit Stoffen der Kokaingruppe Bariumchlorid nicht mehr wie vorher die Gefäße verengt, sondern erweitert. ASHER[4] hat diesen Wirkungswandel auch mit Natriumcholat erzeugen können und ihn, wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, auf eine Beeinflussung der Oberflächenspannung bezogen. Zu diesen Erscheinungen einer inversen Bariumchloridwirkung können einige weitere Beobachtungen hinzugefügt werden.

1. Beobachtungen am überlebenden Kaninchenuterus über eine Hemmung der rhythmischen Bewegungsleistungen und Tonusherabsetzung durch übergroße Bariumchloriddosen.

Die Höhe und Dauer der Bariumkontraktion hängt bei den meisten glattmuskeligen Organen innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches von der Konzentration der zugesetzten Bariumlösung ab. Bei unseren Versuchen erreichten wir durch den Zusatz von 1 ccm einer 1%igen Bariumchloridlösung auf 75 ccm Tyrode meist ein Maximum der Tonushöhe, d. h. bei weiteren Steigerungen der Konzentration nahm die Tonushöhe nur noch wenig zu, und lediglich die Dauer der Bariumwirkung wurde mitunter verlängert. Diese Zunahme der Bariumchloridwirkung mit der Konzentration wurde an Uterusstreifenpräparaten verschiedener Tierarten (Meerschweinchen, Schaf) gefunden, und nur am Kaninchenuterus konnte stets ein weitgehend abweichendes Verhalten großer Bariumchloriddosen beobachtet werden. Während 1 ccm Bariumchloridlösung zu 75 ccm Tyrode sofort nach der Zugabe eine recht beträchtliche Tonussteigerung hervorrief, wurde mitunter der Zusatz der doppelten Bariumchloridkonzentration von

der Kaninchenuterusmuskulatur nicht mit einer größeren, sondern mit einer sehr viel kleineren Tonussteigerung beantwortet. Wie aus Abb. 1a hervorgeht, erhebt sich die Fußlinie der Pendelbewegungen kaum über die Mittelhöhe der früheren Pendelausschläge und sinkt bald wieder etwas ab. Vergrößert man die Dosis abermals um 2 ccm der 1%igen Bariumchloridlösung, so steigt bei einer Gesamtkonzentration 1:2000 die Fußlinie der Pendelbewegungen nicht mehr an, sondern sie sinkt auf die gleiche Höhe herab, die vor dem Bariumzusatz beobachtet wurde; die Pendelbewegungen verschwinden dabei fast völlig und setzen erst nach dem Auswaschen der



a b

Abb. 1 a u. b. Die Wirkung von Barium auf Kaninchenuterus in 75 ccm Tyrode.
a 1. und 2. Pfeil je 2 ccm 1%iges Bariumchlorid; b 1. Pfeil 5 ccm 1%iges Bariumchlorid;
↓ Auswaschen und frische Tyrodelösung.

Bariumchloridlösung in fast unverändertem Maße wieder ein. Bei diesem geschilderten Versuch wurde die Barium-Gesamtkonzentration 1:2000 in zwei zeitlich aufeinanderfolgenden Stufen auf diese überhohe Konzentration gebracht. Wenn man statt dessen zu einem rhythmisch tätigen Kaninchenuterus sofort die einmalige Dosis von 4 ccm einer 1%igen Bariumchloriddosis hinzufügt, so erfolgt in der ersten Phase der Bariumwirkung eine starke Kontraktion des Kaninchenuterus; in der zweiten Phase der Bariumchloridwirkung, die meist nach ganz kurzer Zeit eintritt, sinkt jedoch der Tonus bisweilen tief unter die Höhe der normalen Fußlinie der Pendelbewegungen herunter und die Pendelbewegungen hören vollkommen auf (Abb. 1b).

Diese Wirkung großer Bariumchloriddosen am isolierten Kaninchenuterus findet eine Parallele in der Untersuchung von Takahashi[13], welcher gezeigt hat, daß hohe Kalziumchloriddosen die Bewegungsleistungen des isolierten Kaninchenuterus hemmen. In dieser Beziehung ähneln sich also die auch kolloidchemisch in mancher Hinsicht verwandten Kalzium- und Bariumionen.

2. *Beobachtung einer zweiphasischen Bariumwirkung am überlebenden, mit Chinon vorbehandelten Kaninchenduodenum.*

Am Kaninchenduodenum kommt die Bariumwirkung (1 ccm einer 1%igen Lösung auf 75 ccm Tyrode) als heftige Kontraktion der Längsmuskulatur zum Ausdruck, die aber meist schon nach kurzer Zeit abklingt. Eine etwas atypische Bariumreaktion konnte fast immer an einem mit schwachen Chinonkonzentrationen beeinflußten Kaninchendarm beobachtet werden. (Über die besondere Wirkung von Hydrochinon und Chinon haben L. Ther und E. Lüdde bereits an anderer Stelle dieses Archivs

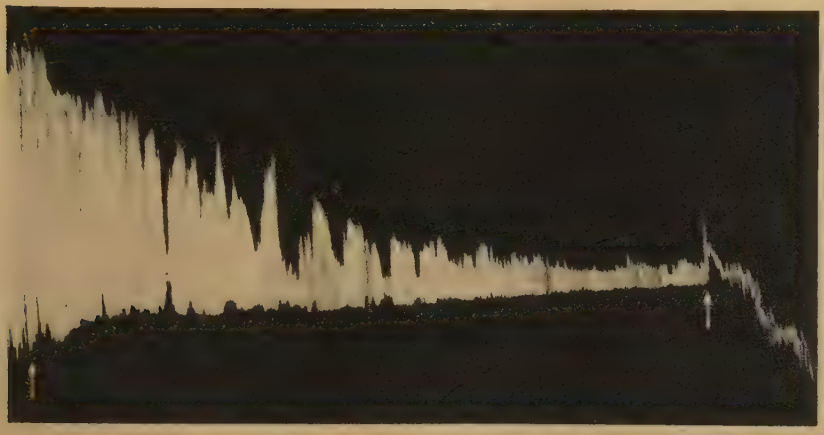


Abb. 2. Die zweiphasische Wirkung von Barium auf Kaninchenduodenum in 75 ccm Tyrode nach Chinonenwirkung.
1. Pfeil: 16^{30}: 2 ccm Chinon 1:2000; 2. Pfeil: 17^{40}: 1 ccm 1%iges Bariumchlorid.

berichtet.) Das Chinon ruft am Kaninchendarm je nach seiner Konzentration eine Hemmung der Bewegungsleistungen der Längsmuskulatur bei starker Erregung der Ringmuskulatur hervor und hebt dabei sehr häufig den Tonus des Präparats, so daß die Fußlinie der Pendelbewegungen auf eine Höhe gehoben wird, die etwa in der Mitte zwischen der Spitze und dem Fußpunkt der ursprünglichen Pendelbewegungen liegt.

Wenn man eine schwache Chinonkonzentration (1:150000) auf den Kaninchendarm einwirken läßt, so beobachtet man häufig, daß sich die Fußlinie der verkleinerten Pendelbewegungen im Verlauf der Einwirkungszeit deutlich über das Anfangsniveau erhebt (Abb. 2). In diesem Zustand reagiert das Kaninchenduodenumpräparat auf den Zusatz von 1 ccm einer 1%igen Bariumchloridlösung fast immer mit einem zweiphasischen Effekt. Die erste Antwort auf die Bariumzugabe ist eine kurz andauernde deutliche Kontraktion. In der zweiten Phase sinkt aber die Fußlinie der Pendelbewegungen weit unter das bisherige Niveau.

Wieweit diese Umstimmung des Kaninchendarms die Folge einer durch Chinonvorbehandlung bedingten Stoffwechselumstimmung ist, bleibt ebenso wie die Frage, ob eine chemische bzw. kolloidchemische Reaktion des Chinons als Ursache der veränderten Bariumreaktion anzusehen ist, offen. Auch die Frage, ob die inverse Bariumreaktion auf eine Veränderung des Funktionszustandes der glatten Muskulatur (Tonuserhöhung) zurückzuführen ist, muß in Erwägung gezogen werden.

B. Beobachtung einer inversen Papaverinwirkung.

Eine Literaturdurchsicht über Beobachtungen von inversen Papaverinwirkungen ergab, daß bereits von K. KÖTSCHAU[14] am überlebenden, durch Sauerstoffentzug geschädigten Kaninchendünndarm eine Besserung der spontanen Rhythmik durch Papaverin beschrieben wurde. Des weiteren wurde von K. KÖTSCHAU[14] eine kontraktionsfördernde Wirkung des Papaverins auf ein Darmstück beobachtet, wenn dieses in einer mit Papaverin versetzten Tyrode im Eisschrank aufbewahrt wird. Stellt man ein Kaninchendarmstück in einer Papavarin. hydrochlor. enthaltenden Tyrodelösung in den Eisschrank und vergleicht es mit einem in gewöhnlicher Tyrode aufbewahrten Kaninchendarm, so sieht man nach 1—3 Tagen zwischen den beiden Därmen einen erheblichen Unterschied. Während die Kontrolle völlig schlaff mit weiten Venen wie abgestorben erscheint, befindet sich der Papaverindarm in einem deutlich kontrahierten Zustand.

Anläßlich einer Untersuchung über die spasmolytische Wirksamkeit von Potentilla anserina wurde folgende Beobachtung einer inversen Papaverinwirkung angestellt.

Gibt man zu einem Kaninchenduodenum bei 37° C in 75 ccm sauerstoffdurchströmter Tyrode 1 ccm einer 1%igen Bariumchloridlösung, so führt das Barium im Moment der Zugabe zu einer heftigen Tonussteigerung, die aber meist nach einigen Minuten zum Fußpunkt der Kurve wiederum abfällt. Schon beim Abfallen dieser Tonussteigerung setzen die Pendelbewegungen, zunächst mit sehr schwachen, sobald die ursprüngliche Fußpunktlinie aber erreicht ist, mit stärkeren Ausschlägen wieder ein. Manchmal treten diese Pendelbewegungen in etwas kürzeren und unregelmäßigen Zeitabständen auf, und auch die Ausschläge, die auf der Kurve verzeichnet werden, sind immer etwas kleiner als die Pendelbewegungen des unvergifteten Präparats vor dem Bariumzusatz. Die Fußpunktlinie dieser Pendelausschläge kehrt meist wieder auf normale Höhe zurück. Die Form der Kurvenschreibung bleibt stundenlang bestehen, und nur das Ausmaß der Pendelbewegungen wird im Verlauf stundenlanger Beobachtungen häufig etwas geringer. Die Abnahme des Ausmaßes der rhythmischen Bewegungsleistungen tritt jedoch nicht früher ein als beim unvergifteten Präparat und etwa auch im gleichen Maße wie bei diesem. Bei dieser Bariumvergiftung beobachtet man außer den Wirkungen auf die Längsmuskulatur, die in den Kurven zum Ausdruck kommen, noch mit dem Auge lebhafte Erregungen der Ringmuskulatur, die als Schnürfurchen auftreten und mit verschiedener Geschwindigkeit in der Längsrichtung des Präparates wandern. Meistens werden sie erst nach Abklingen der Tonussteigerung der Längsmuskulatur, welche durch Bariumeinwirkung hervorgerufen wurde, gut sichtbar und bleiben während der Bariumeinwirkung stundenlang bestehen.

Wie sich ein Papaverinzusatz nun auf ein derart mit Bariumchlorid vorbehandeltes Präparat auswirkt, hängt bei den beschriebenen Versuchsbedingungen ganz wesentlich von der Zeitdauer ab, während welcher das Bariumchlorid auf das Präparat vor dem Papaverinzusatz eingewirkt hat und auch von der Temperatur, bei welcher das Barium das Präparat beeinflußte.

Gibt man wenige Minuten nach dem Abklingen der durch Barium hervorgerufenen Tonussteigerungen und dem Absinken der Fußpunktlinie auf die ursprüngliche Höhe 2 ccm einer 0,2%igen Papaverinlösung hinzu, so stehen die rhythmischen Pendelbewegungen sehr bald still und der Tonus des Präparats sinkt ab, so daß die Fußpunktlinie erheblich unter die Norm abfällt. Auf der Kurve demonstriert sich diese Papaverinlähmung bei mehrstündiger Beobachtung als horizontal verlaufende Linie, die auch später nie mehr ansteigt und keine Pendelbewegungen aufweist. Außer diesem in der Kurve sichtbaren Papaverineffekt auf die mit Barium vorbehandelte Längsmuskulatur beobachtet man sehr bald nach dem Papaverinzustand, daß keine Schnürfurchenbildung mehr auftritt, also keine Kontraktionen der Ringmuskulatur zustande kommen.

Wartet man aber nach dem Bariumzustand etwa 3 Stunden, während welcher das Präparat seine in der Größe etwas reduzierten Pendelbewegungen fortsetzt, und gibt in diesem Zustand 2 ccm einer 0,2%igen Papaverinlösung hinzu, so ist die Hemmung der Ringmuskulatur durch den Papaverinzusatz, soweit die Beobachtung mit dem Auge dies erkennen läßt, die gleiche, wie sie an einem Präparat nach 10 Min. dauernder Bariumvorbehandlung zur Beobachtung kommt. Das Einwirkungsbild des Papaverinzusatzes nach drei- oder mehrstündiger Bariumeinwirkung auf die Längsmuskulatur ist dagegen weitgehend modifiziert, obwohl rein äußerlich zwischen dem Funktionszustand eines Darmpräparats nach 10 Min. andauernder und nach 3 Stunden andauernder Bariumeinwirkung kein wesentlicher Unterschied festzustellen ist. Zunächst bringt auch in diesem Stadium der Papaverinzusatz die Kontraktionen ungefähr ebenso schnell zur Erschlaffung wie bei einem Präparat nach 10 Min. währender Bariumeinwirkung, und auch der Tonus des Darmstückes sinkt unter Abfall der Fußpunktlinie zunächst ähnlich stark ab. Im Gegensatz aber zur 10 Min. währenden Bariumvorbehandlung steigt der Tonus der Längsmuskulatur bei einem 3 Stunden mit Barium vorbehandelten Präparat nach der ersten tonussenkenden Papaverinphase erheblich an, so daß die Fußpunktlinie des Präparats, welches allerdings keine Pendelbewegungen mehr aufweist, weit über die höchste Spitze der vor dem Papaverinzusatz beobachteten Pendelausschläge hinausgeht (Abb. 3).

Die Trägheit, mit welcher die Kurve ansteigt, erinnert an die Tonusschwankungen, die vielen glattmuskeligen Organen eigen ist. Wird das

Papaverin durch Auswaschen mit vorgewärmter, bariumhaltiger Tyrodelösung beseitigt, so verschwindet diese paradoxe Tonussteigerung sehr schnell, um nach abermaligem Papaverinzusatz wiederum aufzutreten, in diesem Wiederholungsstadium aber ohne vorhergehende, stärkere Tonussenkung. Auf diese Weise läßt sich beliebig oft demonstrieren, daß unter besonderen Bedingungen das Papaverin zu einer paradoxen „Tonuszunahme der glatten Muskulatur des Kaninchenduodenums führen kann. Adrenalin und Atropin, die normalerweise den Tonus senken, bleiben ohne Einfluß auf diese paradoxe Tonussteigerung.

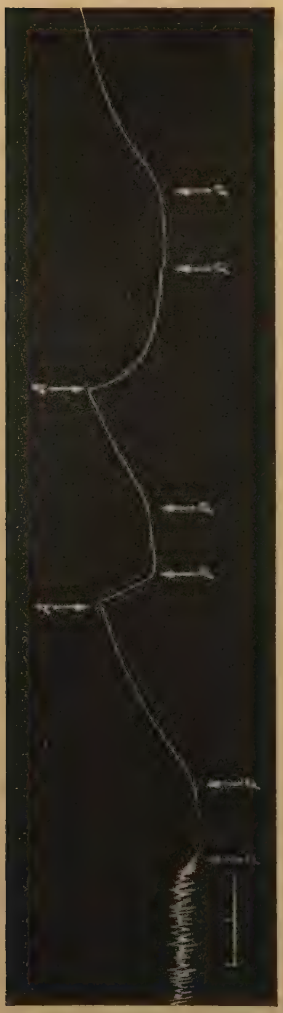


Abb. 3. Die Wirkung von Papaverin auf Kaninchenduodenum in 75 ccm Bariumtyrode. Es bedeuten: *P* 2 ccm 0,2%iges Papaverinhydrochlorid auf 75 ccm Bariumtyrode; *A* Auswaschen mit Bariumtyrode. Zeitmarke 10 Min.

Die nächsten Versuche galten der Feststellung, wie lange eine Barium-Tyrodelösung 1:7500 auf das Kaninchenduodenum einwirken muß, um eine inverse Papaverinwirkung im Sinne einer paradoxen Tonussteigerung hervorzurufen. Die Untersuchungen haben ergeben, daß eine durch Barium bewirkte Veränderung im Muskel, die zur Umkehr der Papaverinwirkung führt, um so rascher erfolgt, je höher die Temperatur ist, bei welcher das Barium auf die glatte Muskulatur einwirkt. Einige Versuche, die zur gleichen Zeit und unter möglichst gleichen Bedingungen, aber bei verschiedener Temperatur (37° C und 42° C) durchgeführt wurden, ergaben folgendes Resultat: Der Bariumzusatz (1 ccm einer 1%igen Lösung auf 75 ccm Tyrode) führt auch bei 42° C zum gleichen Erscheinungsbild, wie es bei 37° bereits beschrieben wurde. Es ergab sich jedoch, daß bei 42° C meist bereits nach einstündiger Bariumeinwirkung 1 ccm einer 0,2%igen Papaverinlösung in der zweiten Wirkungsphase die paradoxe Tonussteigerung erkennen läßt, während bei 37° C nach einstündiger Bariumeinwirkung die gleiche Papaverindosis noch keine paradoxe Tonuszunahme herbeiführt. Nach dreistündiger Einwirkungszeit des Bariums war jedoch auch bei 37° C die glatte Muskulatur des Kaninchenduodenums häufig so beeinflußt, daß ein Papaverinzusatz eine Tonuserhöhung der Längsmuskulatur auslöst.

Diese durch Barium hervorgerufene paradoxe Tonussteigerung des Papaverins konnte bei Wahrung der angegebenen Versuchsbedingungen zu den verschiedensten Jahreszeiten in mehr oder weniger ausgeprägter Form immer wieder beobachtet werden, und zwar gleichgültig, ob der Darm eines frisch getöteten Tieres sofort nach der Entnahme oder erst nach einer einige Stunden währenden Aufbewahrung im Eisschrank bei 3—5° C zur Anwendung kam. Weitere Untersuchungen galten der Frage, ob dieser Zustand, in welchem der Kaninchendarm den paradoxen Papaverintonus zeigt, auch ohne Bariumvorbehandlung zu erreichen ist; deshalb wurde ein Darmstück ohne Bariumzusatz im Tyrodebad solange belassen, bis das Ausmaß der Pendelbewegungen so klein war wie bei einem 3 Stunden mit Barium vorbehandelten Präparat. Der einzige sichtbare Unterschied gegenüber dem mit Barium vergifteten Präparat war nach dieser Zeit eine viel schwächere Ausbildung der Schnürfurchen. Bei derartigen, lediglich durch die Versuchsdauer geschwächten Präparaten konnte kein paradoxer Papaverintonus beobachtet werden. Bei dieser mit der Dauer der Bariumeinwirkung sich bildenden Zustandsänderung, die den paradoxen Papaverintonus ermöglicht, scheint also das Barium selbst eine beträchtliche Rolle zu spielen und nicht etwa der einfache Ermüdungszustand des Präparats.

Bei diesem paradoxen Papaverintonus des mit Barium vorbehandelten Kaninchenduodenums fällt besonders auf, daß die inverse Reaktion erst mehrere Stunden nach Beginn der Bariumvorbehandlung auftritt, obwohl nach mehrstündiger Bariumvergiftung der mechanische Spannungs- und Bewegungszustand des Darmstücks sich nur unwesentlich von dem Vergiftungszustand unterscheidet, welcher 10 Min. nach dem Abklingen der Bariumkontraktion zu beobachten ist. Man könnte hier daran denken, daß in dieser Zeitspanne von 3 Stunden im Stoffwechsel des Präparats eine Änderung eingetreten ist, die die nachfolgende Papaverinwirkung modifiziert. Über die Art der Stoffwechselprodukte kann zunächst nichts ausgesagt werden. Es ist nun hinreichend bekannt, daß Alkaloide ihrerseits in den Stoffwechsel eingreifen können, und zwar unter Umständen durch Additionsreaktionen an Co-Fermente des Stoffwechsels (Labes und Bergstermann[8]). Bei Chinolinderivaten wie Chinin sind derartige Stoffwechselreaktionen bekannt und auch bei Isochinolinderivaten wie Emetin und Papaverin liegen solche Vermutungen nahe. Bei den Additionsreaktionen von Alkaloiden an Produkte des Stoffwechsels muß man auch an starke Veränderungen der Oberflächenspannung denken, denn Bergstermann[15] hat nachgewiesen, daß gewisse Additionsverbindungen alkaloidähnlicher Substanzen sich viel stärker in Grenzflächen anreichern als alkaloidähnliche Substanzen allein. Wenn auch das Papaverin selbst in der in unseren Versuchen angewandten Konzentration die mit einem Stalagmometer gemessene Tropfenzahl der Tyrodelösung praktisch kaum verändert, so besteht immerhin noch die Möglichkeit, daß es in dem mit Barium

vergifteten Darmstück Reaktionspartner findet, die seine Oberflächenaktivität außerordentlich erhöhen.

Insofern könnte man im Sinne von ASHER[4] an die Möglichkeit denken, daß durch derartige oberflächenaktive Reaktionsprodukte entweder die Zellmembranen erhöhte Durchlässigkeit aufweisen, oder die inneren Grenzflächen der Zellstrukturen in ihrer Reaktionsbereitschaft gegenüber irgendeinem Wirkstoff verändert sind. So könnte unter Umständen das in der Tyrodelösung immer noch vorhandene Barium eine verstärkte Reaktionsbereitschaft für seinen tonussteigernden Effekt vorfinden. In diesem Falle wäre also der paradoxe Papaverintonus in Wirklichkeit eine Sensibilisierung für den tonisierenden Bariumeffekt.

Ob nun die Änderungen im Stoffwechsel oder in den Phasengrenzflächen der Strukturbestandteile, welche zur Bereitschaft für den paradoxen Papaverintonus führen, in der angedeuteten Weise zustande kommen, darüber konnten keinerlei Anhaltspunkte erhalten werden. Jedenfalls müssen aber die Vorgänge ziemlich spezifisch sein, denn ein derartiger Papaverintonus nach Bariumvergiftung konnte nur beim Kaninchenduodenum in diesem Ausmaße beobachtet werden. Dagegen wurde aber häufig gesehen, daß das Barium nach einer längeren Latenzzeit auch andere glattmuskelige Organe in eine wesentlich veränderte Reaktionsbereitschaft gegenüber anderen Wirkstoffen versetzt. Bei diesen Erscheinungen, die einer weiteren Mitteilung vorbehalten bleiben, liegen die Verhältnisse jedoch insofern anders, als diese veränderte Reaktionsbereitschaft auch äußerlich an eine veränderte Funktionsform, d. h. eine Veränderung des Bewegungsrhythmus bzw. des Spannungszustandes geknüpft ist.

Zusammenfassung.

Unter einem Wirkungswandel versteht ASHER die Erscheinung, daß ein Wirkstoff unter bestimmten Bedingungen nicht die ihm herkömmliche Wirkung ausübt, sondern die umgekehrte Wirkung. Abgetrennt vom Begriff des Wirkungswandels wird als Phasenwirkung die Erscheinung bezeichnet, daß ein Organ unter bestimmten Bedingungen einen Reiz durch wellenförmig aufeinanderfolgende entgegengesetzte Vorgänge beantwortet. Zu diesem Kapitel wurden folgende Beobachtungen angestellt:

Am Kaninchenuterus konnte gezeigt werden, daß hohe Bariumchloriddosen ähnlich wie hohe Kalziumdosen den Tonus und die Bewegungsleistungen hemmen. Am Kaninchenduodenum, welches mit Chinon vergiftet wurde, zeigt das Barium eine deutlich zweiphasische Wirkung, indem es die Längsmuskulatur des Kaninchendarms nach kurz andauernder Erregung zur Erschlaffung bringt.

Läßt man auf ein Kaninchenduodenum in der MAGNUSschen Versuchsanordnung Bariumtyrode (1:7500) einige Stunden einwirken, so zeigt eine

hinzugefügte Papaverindosis (2 ccm einer 0,2%igen Papaverinlösung auf 75 ccm Tyrode) meist eine deutlich zweiphasische Wirkung. Nach Lähmung der Pendelbewegungen und Tonusherabsetzung kommt es innerhalb einiger Minuten zu einer paradoxen Tonussteigerung der Längsmuskulatur, die sich durch Auswaschen mit Bariumtyrode beseitigen läßt.

Literatur.

[1] Buchheim, R.: In Jonathan-Pereiras Handbuch der Arzneimittellehre. Leipzig: L. Voß 1846. — [2] Schmiedeberg, O.: Grundriß der Arzneimittellehre. Leipzig: F. C. W. Vogel 1883. — [3] Rentz, E.: Inaug.-Diss. Riga 1930. — [4] Asher, L.: Der Wirkungswandel neurovegetativer Arzneimittel. Bern: Hans Huber 1941. — [5] Hazama, F.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **106**, 223 (1925). — [6] Langmuir, J. u. K. B. Blodget: Lilly Res. Lab. Dedic. 80. Indianapolis 1934. — [7] Neuschlosz, S.: Pflügers Arch. **181**, 17 (1920). — [8] Labes, R.: Veröff. Z.stelle Baln. **1929**, H. 10. — Naunyn-Schmiedebergs Arch. **141**, 148 (1929); **174**, 225 (1934); **175**, 372 (1934); **190**, 421 (1938); **191**, 55 (1938). — [9] Magnus R.: Pflügers Arch. **102**, 123 (1904); **108**, 1 (1905). — [10] Kehrer, E.: Arch. Gynäk. **81**, 160 (1907). — [11] Boehm, R.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **3**, 216 (1875). — [12] Führer, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **82**, 51 (1918). — [13] Takahashi, Y.: Ber. Physiol. usw. **42**, 540. — [14] Kötschau, K.: Zum Aufbau einer biologischen Medizin I. Stuttgart: Hippokrates Verl. 1935. — [15] Bergstermann, H. u. O. Elbracht: Biochem. Z. **310**, 64 (1941).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Leipzig (Direktor: L. Lendle).

Über die Störung des Kohlehydratstoffwechsels durch 1,2,4-α-Dinitrophenol und Pervitin und ihre Beeinflussung durch Askorbinsäure und Nebennierenrindenhormon*.

Von

H. T. A. Haas.

(Unter Benutzung der Versuchsergebnisse von cand. med. W. Kolditz.)

(Eingegangen am 17. Juni 1944.)

Unter den Giften mit einem schädigenden Einfluß auf den Kohlehydratstoffwechsel nimmt das 1,2,4-α-Dinitrophenol (Dinitroph.) anscheinend eine gewisse Sonderstellung ein. Nach der Ansicht aller bisherigen Untersuchungen ist sein Angriffspunkt ausschließlich in den peripheren Gewebszellen zu suchen, da seine Wirkung in einer starken Anfachung der peripheren Oxydationsprozesse besteht. Hierbei findet vor allem im Zuckerhaushalt ein erhöhter Umsatz statt. Dieser gibt sich aus dem Auftreten einer Hyperglykämie[1, 2, 3] und einer Abnahme des Glykogens in Leber und Muskulatur zu erkennen. Die Steigerung des Kohlehydratumsatzes soll in engem Zusammenhang mit der Stimulation der Oxydationsprozesse stehen, da nach Ehrenfest und Ronzoni[4] eine Hemmung der Glykolyse in der Muskulatur durch Jodazetat die Wirkung des Dinitroph. auf die Muskulatur vermindert und nach Magne[2] die Steigerung der Oxydation erheblich langsamer und geringgradiger erfolgt, wenn die Tiere zuvor gehungert bzw. eine Adrenalininjektion erhalten haben.

Diese Wirkung ließ uns das Dinitroph. besonders geeignet erscheinen, um mit seiner Hilfe zu prüfen, ob bestimmte Substanzen wie die Askorbinsäure (Ask.) oder das Nebennierenrindenhormon (DCA.) eine glykogenschützende Wirkung entfalten. Für dieses Vitamin bzw. Hormon ist bereits mehrfach behauptet worden, daß sie Beziehungen zum Kohlehydratstoffwechsel haben, und daß sie insbesondere den Glykogenschwund in Leber und Muskulatur zu hemmen vermögen.

So soll die Ask. den Glykogenverlust nach erschöpfender Muskelarbeit und die bei Anstrengung auftretende Hyperglykämie und Milchsäureverschiebung aus-

* Herrn Geh.-Rat Prof. Dr. Straub zum 70. Geburtstag gewidmet.

[1] Tscherkess, Melnikowa u. Dubaschinskaja: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **179**, 1 (1935). — [2] Magne, Mayer u. Pantefol: Ann. Physiol. (Fr.) **7**, 269 (1931); 8, 1, 51 (1932). — [3] Heymans u. Bouckaert: Ndld. Tschr. Geneesk. **1932**, 3649. — [4] Ehrenfest u. Ronzoni: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **31**, 318 (1933).

gleichen[5–9]. Auch ohne Beanspruchung der Tiere durch eine hohe Arbeitsleistung wurde vielfach ein Anstieg des Glykogengehaltes von Muskel und Leber bei Ask.-Zufuhr gefunden[10–16]. Allerdings konnte dieser Effekt nicht von allen Untersuchern bestätigt werden[17–19]. Bei sehr hoher Dosierung erzielte D'Allessandria[20] sogar eine Senkung des Glykogenbestandes.

Außerdem wurde beobachtet, daß Ask. den durch andere Gifte verursachten Verlust an Glykogen in Leber und Muskulatur auszugleichen oder zu mindern vermag. Dies gilt z. B. für Thyroxin, bei dem durch hohe Ask.-Gaben nicht nur ein Glykogenschwund verhütet[10,21,24], sondern auch die Störung des Milchsäure- und Kreatinstoffwechsels beseitigt[25] und die thyreotoxische Kreatinurie unterdrückt werden konnte[23,27,28]. Allerdings liegen für das Glykogen auch gegenteilige Angaben vor[26]. Ebenso garantiert beim thyreotropen Hormon eine Vorbehandlung der Tiere mit großen Dosen von Vitamin C eine Stabilisierung des Leberglykogens[28], und sie verhindert die durch das thyreotrope Hormon verursachte Mobilisation des Muskelglykogens[23]. Ferner soll die Ask. bei der Chloroform-[29,30] und Phosphorvergiftung[28,30,31] die inneren Organe weitgehend vor der Verfettung und vor Glykogenverlust schützen. Ebenso wird ihr eine günstige Wirkung bei der Phenylchinolinkarbolsäurevergiftung zugeschrieben und sie verhindert auch hier eine Schädigung der Leber[32]. Der Glykogenschwund nach Äther konnte dagegen durch die Ask.-Zufuhr nicht aufgehalten werden[33].

Ähnlich wird auch für DCA. angegeben, daß es zur Bekämpfung von Leberschäden (hepatozellulärer Ikterus, Cholangitis, Leberzirrhose) geeignet ist, da es den Glykogenschwund in der Leber deutlich zu hemmen vermag[34–45]. Entsprechend fand

---

[5] Baena: Biochem. Z. **244**, 363 (1934). — Ann. int. Med. (Am.) **5**, 553 (1936). — [6] Ratsimamanga: C. r. Soc. Biol. **126**, 1134 (1937); **131**, 863 (1939). — [7] Grolitsch u. Stöger: Klin. Wschr. **1941**, 1136. — [8] Viereck: Diss. Berlin 1941. — [9] Groth: Z. Vitaminforsch. (Schwz.) **2**, 26 (1938). — Diss. Berlin 1941. — [10] Altenburger: Klin. Wschr. **1936 II**, 1129. — Altenburger u. Diehl: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **193**, 10 (1939. — [11] Fichera: Arch. Biol. Med. sper. **6**, 49 (1940). — [12] Morell: Dtsch. med. Wschr. **1940 I**, 398. — [13] Morelli u. D'Ambrosio: Arch. Sci. biol. (It.) **24**, 351 (1938). — [14] Piery, Cordier u. Enselme: Bull. Acad. Méd. (Belg.) **123**, 318 (1940). — [15] Terada: Tôhoku J. exper. Med. (Jap.) **36**, 180 (1939). — [16] Ziemke: Z. exper. Med. **106**, 704 (1939). — [17] Lauber: Arch. klin. Chir. **193**, 749 (1938). — [18] Langfeld: Skand. Arch. Physiol. (D.) **80**, 123 (1938). — [19] Shimamura: Fol. pharmacol. jap. **25**, II., 30 (1938). — [20] D'Allessandria: Minerva med. (It.) **30**, 273 (1939). — [21] Hirsch: Biochem. Z. **287**, 126 (1936). — Naturw. Tijdschr. **21**, 363 (1940). — [22] Nespor: Klin. Wschr. **1937 I**, 567. — [23] Steffen u. Zois: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **189**, 75 (1938). — [24] Oehme: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **184**, 558 (1936). — [25] Thaddea: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **190**, 227 (1938). — [26] v. Plehwe: Klin. Wschr. **1939 II**, 1619. — Arch. klin. Med. **182**, 145. — [27] de la Bernardi: C. r. Acad. Sci. **208**, 1170 (1938). — [28] Terbrüggen: Verh. path. Ges. **31**, 114 (1939). — Zbl. Path. **71**, 114 (1939). — Terbrüggen u. Fischbach: Klin. Wschr. 1937 **II**, 1125. — Virchows Arch. **301**, 186 (1938). — [29] Simizu: Tôhoku J. exper. Med. (Jap.) **36**, 211 (1939). — [30] Watanabe: Tôhoku J. exper. Med. (Jap.) **35**, 565 (1939). — [31] Donatelli u. Papini: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **15**, 661 (1940). — [32] Tagariello: Sperimentale **93**, 429 (1939). — [33] Lauber: Z. exper. Med. **102**, 1 (1937). — [34] Beiglböck: Wien. klin. Wschr. **1941**, 262. — [35] Elert: Zbl. ges. Gynäk. **1942**, 1538. — [36] Eppinger: Wien. klin. Wschr. **1939 I**, 637. — [37] Heni: Z. klin. Med. **139**, 698 (1941). — [38] Köhler: Klin. Wschr. **1941**, 716. — [39] Möschl: Z. klin. Med. **136**, 601 (1939). — [40] Nonnenbruch: Dtsch. med. Wschr. **1941**, 1055. — Schweiz. med. Wschr. **1941**, 1193. — [41] Thaddea: Die Nebennierenrindeninsuffizienz und ihr Formkreis. Stuttgart: Ferdinand Enke

Seckel[46], daß Nebennierenextrakt bei in vitro atmenden Leberschnitten den Glykogenschwund stärker hemmt, als es mit Insulin möglich ist. Auch das Absinken des Blutvolumens, Blutchloridgehaltes und Blutzuckers, das bei Ratten nach der Entfernung des Lebergewebes bis auf 85% auftritt, ist durch eine Zufuhr von Nebennierenrindenhormon zu verhüten[46]. Ebenso verhindert DCA. nach den Befunden von Gerald und Verzár[47] den Glykogenverlust bei hypophysektomierten Ratten, bei denen ohne diese Vorbehandlung nach achtstündigem Hungern der Glykogengehalt der Leber auf sehr niedrige Werte abfällt. Auch bei der experimentell erzeugten Hyperthyreose ist über günstige Erfolge berichtet. So fand Oehme[24], daß bei langfristiger Hyperthyreose die Leberglykogenverarmung durch DCA. teilweise verhindert wird. Gleichartige Wirkungen hat Thaddea[48] für Pancortex mitgeteilt. Ferner sahen Oettel und Frank[49] günstige Erfolge bei Patienten mit Basedow und einer deutlichen Leberfunktionsstörung. Im Tierexperiment konnten diese Autoren außerdem die Leberschädigung nach Allylformiat hemmen und die Überlebensdauer der Tiere durch die DCA.-Zufuhr um 30% erhöhen. Auch bei anderen membranschädigenden Giften wie Thyroxin, Histamin und Ammoniak ließ sich eine hemmende Wirkung für das DCA. zeigen. Übereinstimmend hierzu gibt Beiglböck[24] an, daß die seröse Hepatitis und auch die Cirrhosis hepatis bei der Allylformiatvergiftung durch Nebennierenrindenhormon in Verbindung mit Laktoflavin zu verhindern ist.

Wird die Zufuhr des DCA. mit Ask. kombiniert, so darf man im allgemeinen eine wesentliche Verstärkung der Wirksamkeit erwarten.

Nach Oettel und Frank[49] ist z. B. bei der Allylformiatvergiftung eine bessere Gegenwirkung so zu erzielen. Ähnlich wird der Zwergwuchs des Hundes, der nach unvollständiger Nebennierenausschaltung entsteht, durch eine kombinierte Zufuhr von Ask. und DCA. besser behoben, als durch eine alleinige Behandlung mit Rindenhormon bzw. Ask.[50]. Auch bei der durch Nebennierenunterfunktion hervorgerufenen negativen Kalzium- und Phosphorbilanz, die auf eine gesteigerte Mineralausfuhr zurückgeht, ist die kombinierte Behandlung weit überlegen[50]. Am isolierten Froschherzen bewirkt außerdem die gleichzeitige Zufuhr von Ask. und DCA. eine weit stärkere und raschere Zunahme der Herzarbeit, als wenn das Hormon allein zugegeben wird[51]. Nach Giroud und Ratsimamanga[52] wird der Glykogengehalt der Muskulatur bei gleichzeitiger Zufuhr von Ask. und DCA. bis zu 300% erhöht. Durch die Ask. allein wird dagegen das Glykogen nur wenig, durch Cortin allein wird es überhaupt nicht vermehrt. Schließlich erwies sich die kombinierte Behandlung bei der Bekämpfung des anaphylaktischen Schocks der ausschließlichen Verwendung des Rindenhormons wie auch der Ask. deutlich überlegen[53, 54].

In Erweiterung dieser Befunde wurde geprüft, inwieweit auch der durch Dinitroph. ausgelöste Glykogenverlust in Leber und Muskulatur durch eine Vorbehandlung mit Ask. bzw. DCA. ausgeglichen oder beseitigt wird, um vor allem an diesem Beispiel quantitative Anhaltspunkte über die

1941. — [42] Uexküll: Dtsch. med. Wschr. **1939 I**, 509. — [43] Varga: Klin. Wschr. **1943**, 168. — [44] Bernhardt: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **1934**, 343. — [45] Seckel: Endocrinology (Am.) **26**, 97 (1940).

[46] Seyle u. Dosne: Amer. J. Physiol. **128**, 729 (1940). — [47] Gerald u. Verzár: Pflügers Arch. **242**, 30 (1939). — [48] Thaddea: Z. exper. Med. **95**, 600 (1935). — [49] Oettel u. Frank: Z. exper. Med. **110**, 535 (1942). — [50] Lucke: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **187**, 416 (1937); **189**, 87 (1938). — [51] Gantenbein: Z. Biol. **100**, 8 (1940). — [52] Giroud u. Ratsimamanga: Presse méd. **1940**, 356. — [53] Ogawa: Jap. J. med. Sci. **3** 162 (1940). — [54] Hofmann: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **199**, 631 (1942).

glykogenschützende Wirksamkeit dieser beiden Stoffe bzw. über das Ausmaß der gegenseitigen Verstärkung ihrer Wirksamkeit zu erlangen.

Im Vergleich zum Dinitroph. wurde noch das Pervitin in diese Untersuchungen mit einbezogen. Wir wählten diese Substanz, da sich in früheren Versuchen[55] über den Einfluß der Ask. auf künstlich erzeugte Fieberzustände zeigen ließ, daß Ask. in hoher Dosierung die temperatursteigernde Wirkung von Dinitroph. unterdrückt, daß sie aber bei anderen fiebererzeugenden Pharmaka, wie z. B. bei Pervitin, in dieser Hinsicht versagt. Wir deuteten diesen Befund aus dem verschiedenartigen Wirkungscharakter dieser beiden Stoffe. Beim Dinitroph. soll die Wirkung vor allem auf einer Beeinflussung der peripheren Oxydationsprozesse und einem vermehrten Abbau der Kohlehydrate beruhen. Beim Pervitin sind dagegen sicherlich am Zustandekommen des gesamten Vergiftungsbildes neben der Beeinflussung der peripheren Gewebe durch eine Sympathikuserregung noch zentrale Wirkungskomponenten mit einer Erregung der zentral gelegenen vegetativen Zentren maßgeblich beteiligt. Für die Untersuchung der glykogenschützenden Wirksamkeit von Ask. und DCA. schien es daher zweckmäßig, auch stoffwechselwirksame Substanzen dieser Art im Vergleich zum Dinitroph. zu prüfen.

Nach den Untersuchungen von Verzár[56] besteht die basale Stoffwechselstörung nach der Entfernung der Nebenniere in einer Verminderung der Phosphorylierungsvorgänge, die am Kohlehydratauf- und -abbau beteiligt und mit dem Kaliumstoffwechsel gekoppelt sind. Dementsprechend wird auch nach dieser Auffassung der therapeutische Effekt des Rindenhormons vor allem in einer Beseitigung der gestörten Phosphorylierungsprozesse gesehen. Es wurde daher ebenfalls untersucht, ob Dinitroph. bzw. Pervitin einen Einfluß auf die Glykogenphosphorylierung besitzen und wieweit derartige Störungen eventuell durch eine Zufuhr von Rindenhormon bzw. durch eine kombinierte Verabreichung von Ask. und DCA. ausgeglichen werden könnten.

Es ergaben sich somit, nachdem in Vorversuchen der Einfluß von Dinitroph. und Pervitin auf den Glykogenbestand von Leber und Muskulatur bzw. auch die Glykogenphosphorylierung festgelegt war, insgesamt folgende Fragestellungen: 1. Sind Ask. bzw. DCA. in der Lage, den durch Dinitroph. bzw. Pervitin verursachten Glykogenschwund auszugleichen? 2. Wirken Asc. und Rindenhormon beim Schutz des Glykogenbestandes gegenseitig verstärkend aufeinander ein? 3. Steht der glykogensenkende Einfluß von Pervitin und Dinitroph. in Zusammenhang mit einer Störung

[55] Haas: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **192**, 331 (1939). — [56] Verzár: Die Funktion der Nebennierenrinde. Basel 1939. — Schweiz. med. Wschr. **71**, 878 (1941). — Verzár, Bucher, Somogyi u. Wirz: Helvet. med. Acta **7**, 6, 58 (1941). — Verzár u. Montigell: Helvet. chim. Acta **25**, 9, 22 (1942). — Verzár u. Pulver: Helvet. chim. Acta **23**, 1087 (1940); **24**, 272 (1941).

der Phosphorisierungsvorgänge und ist die Gegenwirkung des Rindenhormons auf eine Restitution der Phosphorylierung zur Norm zurückzuführen? Als Nebenbefund ergaben sich bei diesen Untersuchungen außerdem einige Beobachtungen über den Einfluß der Ask. auf den Glykogenbestand unbehandelter Ratten.

I. Glykogenbestimmungen in Leber und Muskulatur.

Die Versuche wurden an weißen Ratten ausgeführt. In Vorversuchen wurde zunächst der Glykogengehalt von Leber und Muskulatur an unbehandelten Tieren festgestellt. Die Tötung der Tiere für die Entnahme von Leber und Gastrocnemius erfolgte in Anbetracht der rhythmischen Tagesschwankungen des Glykogengehalts in den inneren Organen stets zum gleichen Zeitpunkt zwischen 10 und 11 Uhr vormittags. Dies gilt auch für alle weiteren Versuchsreihen. Die Tiere wurden 12 Stunden vor dem Versuch nüchtern gesetzt. Die Glykogenbestimmung wurde nach einer von Hochfeld[57] angegebenen Methodik ausgeführt. Bei allen in der Tabelle angegebenen Einzelwerten handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei Bestimmungen an der Leber bzw. Muskulatur des gleichen Tieres.

Tabelle 1. *Kontrollversuche.* Glykogengehalt in %.

Leber					Mittelwert	Muskel					Mittelwert
3,98	4,15	4,33	3,74	3,73	3,74	0,43	0,58	0,75	0,63	0,60	0,51
3,07	4,05	3,71	3,82	4,23	± 0,17	0,54	0,44	0,45	0,43	0,51	± 0,03
3,37	3,42	2,89				0,45	0,44	0,45	0,36		

Die Kontrollversuche wurden zu verschiedenen Zeiten im Laufe der gesamten Untersuchungen vorgenommen. Sie bestätigen wiederum, daß der Gehalt der inneren Organe an Glykogen bei den einzelnen Tieren erheblichen Schwankungen (Leber 2,89—4,33%, Muskel 0,36—0,75%) unterliegt.

1,2,4-α-Dinitrophenol und Pervitin.

Das Dinitroph. wurde subkutan zugeführt. Nach zweistündiger Einwirkungsdauer wurden die Tiere getötet und der Glykogengehalt von Muskel und Leber bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt hat nach früheren Untersuchungen der Fieberanstieg und damit die Zunahme der Oxydationsvorgänge etwa das Maximum erreicht. Als Dosis wählten wir 1,0 und 2,5 mg je 100 g Ratte. Die höhere Dosis liegt bereits im unteren Bereich der tödlichen Gaben. Nach Cutting und Tainter[58] bewirkt 1 mg/100 g durchschnittlich einen Temperaturanstieg von 1,6°. 2,5 mg/100 g erzielen eine Zunahme der Körpertemperatur um 2,6°. In den früheren eigenen Versuchen wurde bei der niedrigen Dosierung ein Temperaturanstieg von 0,9° gefunden. Bei 2,5 mg/100 g nahm die Körpertemperatur im Mittel um 2,3° zu.

[57] Hochfeld: Biochem. Z. **282**, 392 (1935). — [58] Cutting u. Tainter: J Pharmacol. (Am.) **48**, 410 (1933); **49**, 187 (1933).

Die Mortalität beträgt nach CUTTING und TAINTER bei subkutaner Zufuhr von 2,5 mg/100 g 50%; 5 mg/100 g wirken 100% letal. Nach TSCHERKESS[1] liegt die absolut tödliche Gefahr für die Ratte bei 4,5 mg je 100 g. Wir fanden bei 2,5 mg/100 g eine 25%ige Mortalität. Bei 5,0 mg je 100 g starben 92% der Tiere. Diese Angaben gelten allerdings nur für die älteren Versuchsreihen mit unbegrenzter Beobachtungsdauer. In den vorliegenden Versuchen kam bei einer auf 2 Stunden befristeten Einwirkungsdauer des Dinitroph. keines der Tiere ad exitum.

Pervitin wurde ebenfalls subkutan injiziert, und zwar in drei verschiedenen Dosen: 0,5, 0,75 und 1,0 mg/100 g. Auch bei diesen Versuchen wurde

Tabelle 2. *1,2,4-α-Dinitrophenol und Pervitin.* Glykogengehalt in %.

Dinitrophenol-Dosis mg/100 g	Leber	Mittelwert	Muskel	Mittelwert
1,0	1,44 1,47 2,48 1,61 1,90 1,60 1,34 1,60	**1,68** ± 0,14	0,35 0,32 0,43 0,25 0,47 0,31 0,31 0,25	**0,34** ± 0,04
2,5	1,13 2,53 1,03 1,85 1,04 2,10 2,22 1,67 1,72 2,02	**1,73** ± 0,19	0,37 0,32 0,27 0,17 0,15 0,16 0,27 0,31 0,23 0,25	**0,25** ± 0,03
Pervitin				
0,5	2,57 3,39 4,13 3,82	**3,48** ± 0,38	0,44 0,53 0,60 0,65	**0,55** ± 0,05
0,75	1,72 1,61 2,55 3,23 2,10 1,64	**2,14** ± 0,27	0,34 0,32 0,61 0,38 0,63 0,74	**0,50** ± 0,08
1,0	1,36 2,02 1,85 1,66 1,30 1,78 3,21 2,99 2,38 1,71 2,19	**2,04** ± 0,18	0,43 0,40 0,43 0,62 0,42 0,46 0,46 0,16 0,37 0,38 0,51	**0,42** ± 0,03

das Glykogen 2 Stunden nach der Zufuhr bestimmt, da auch beim Pervitin das Maximum des Temperaturanstiegs zwischen 1—$2^1/_2$ Stunden erreicht wurde. Bei der Dosierung von 0,75 mg/100 g wurde in den früheren Untersuchungsreihen eine Temperatursteigerung von 1^0 beobachtet, bei der Gabe von 1,0 mg/100 g betrug die Erhöhung der Körpertemperatur im Mittel $1{,}9^0$. Gleichzeitig wurden bei diesen Dosierungen bedeutende Erregungszustände beobachtet. Die höchste Dosierung von 1,0 mg/100 g liegt bereits in unmittelbarer Nähe der letalen Gaben. In den früheren Versuchen mit unbefristeter Einwirkungsdauer starben 2—12 Tiere.

Beide benutzte Dinitroph.-Dosen bewirken eine Senkung des Glykogens in Leber und Muskulatur. Der Abfall des Glykogens ist so beträchtlich, daß auch bei der Auswertung nach statistischen Methoden[59] ein eindeutiger Unterschied zur Norm nachweisbar ist. Differenzen in der Stärke der Wirksamkeit sind trotz der verschieden hohen Dosierungen im Verhalten des Leberglykogens nicht nachweisbar. Auch in der Muskulatur ist die Abnahme des Glykogens bei der höheren Dosierung nur geringgradig stärker ausgeprägt.

[59] FISHER: Statist. Method. Res. Workers. Edinburgh 1925.

Ebenso bewirkt Pervitin in Dosen von 0,75 und 1,0 mg/100 g einen eindeutigen Abfall des Leberglykogens. Auch hier bestehen keine wesentlichen Unterschiede in der Wirkstärke bei beiden Dosierungen. Bei der Zufuhr von 0,5 mg/100 g bleibt der Glykogenbestand der Leber unbeeinflußt. Das gleiche gilt auch für das Muskelglykogen, bei dem selbst die höheren Gaben keine sicher nachweisbaren Abweichungen von der Norm erzielen

Askorbinsäure.

Vor der Ermittlung des Einflusses der Ask. auf die glykogensenkende Wirkung von Dinitroph. und Pervitin wurden einige Untersuchungsreihen durchgeführt, in denen erneut der Einfluß der Ask. selbst auf das Glykogen von Leber und Muskel festgestellt wurde. Auch in diesen Versuchen wurden die Tiere 2 Stunden nach der Injektion der Ask. getötet. Die Zufuhr der Ask. erfolgte subkutan.

Tabelle 3. *Askorbinsäure.* Glykogengehalt in %.

Ask.-Dosis mg/100 g	Leber			Mittelwert	Muskel			Mittelwert
2,5	3,06	4,50	4,03	3,03 ± 0,42	0,62	0,49	0,63	0,63 ± 0,07
	2,03	2,31	2,27		0,97	0,48	0,57	
25,0	3,77	3,55	2,69	3,38 ± 0,26	0,67	0,63	0,70	0,59 ± 0,04
	3,61	4,22	2,15		0,51	0,46	0,51	
	3,78				0,69			
100,0	2,94	3,24	2,26	2,50 ± 0,31	0,60	0,64	0,56	0,59 ± 0,04
	3,24	1,20	2,15		0,74	0,46	0,53	

Mittlere Gaben bewirken demnach unter den gewählten Versuchsbedingungen (2 Stundenversuche) keine wesentlichen Verschiebungen des Glykogengehaltes in der Leber. Die erzielte Abnahme liegt noch deutlich innerhalb der normalen Schwankungsbreite. Das gleiche gilt auch für die leichte Zunahme des Glykogens in der Muskulatur.

Die hohe Ask.-Dosis von 100 mg/100 g bewirkt dagegen schon nach 2stündiger Einwirkungsdauer einen starken Abfall des Glykogengehaltes in der Leber. Auch bei einer Außerachtlassung des einen Ausbeißers in dieser Versuchsreihe bleibt die Abnahme des Leberglykogens für diese hohe Dosis statistisch einwandfrei gesichert.

1,2,4-α-Dinitrophenol und Pervitin nach Vorbehandlung mit Askorbinsäure.

Für die Vorbehandlung mit Ask. wurden die Tiere bei der niedrigen Dinitroph.-Dosis von 1,0 mg/100 g jeweils 3mal mit 10 mg/100 g Ask. behandelt, indem am 3. Tage bzw. 1 Tag vor dem eigentlichen Versuch und außerdem am Versuchstage selbst diese Ask.-Menge subkutan injiziert wurde. Bei der höheren Dinitroph.-Dosis von 2,5 mg/100 g wurden dagegen

nur 1mal unmittelbar vor der Dinitroph.-Injektion, aber örtlich getrennt, 2,5 mg/100 g bzw. 25,0 mg/100 g Ask. zugeführt.

Ebenso wurde bei den Pervitinversuchen die Ask. in Gaben von 2,5 bzw. 25,0 mg/100 g direkt vor der Pervitininjektion einmal subkutan injiziert. Auch hierbei wurden beide Injektionen an verschiedenen Stellen bei den Tieren vorgenommen.

Tabelle 4. *Einfluß von Askorbinsäure auf 1,2,4-α-Dinitrophenol bzw. Pervitin.* Glykogengehalt in %.

Ask.-Dosis mg/100 g	Dinitroph.-Dosis mg/100 g	Leber	Mittelwert	Muskel	Mittelwert
10,0*	1,0	1,57 2,15 1,83 1,35	1,75 ± 0,17	0,32 0,51 0,44 0,23	0,38 ± 0,06
2,5	2,5	0,95 2,32 2,68 1,62 1,71 1,97 1,25	1,79 ± 0,23	0,10 0,58 0,30 0,47 0,31 0,11 0,38	0,31 ± 0,07
25,0	2,5	1,04 0,99 0,85 1,14 0,75 1,01	0,96 ± 0,06	0,22 0,13 0,23 0,19 0,23 0,61	0,27 ± 0,07
	Pervitin				
2,5	1,4	1,74 2,07 1,85 1,26 5,09 1,37 1,64 1,86	2,11 ± 0,44	0,65 0,71 0,58 0,43 0,47 0,37 0,63 0,49	0,54 ± 0,04
25,0	1,0	2,00 1,90 2,85 3,30 2,20 2,09 2,30 4,46 2,53 1,21	2,48 ± 0,28	0,26 0,69 0,42 0,43 0,19 0,39 0,56 0,71 0,56 0,35	0,46 ± 0,06

Die Ergebnisse dieser Tabelle besagen, daß die Ask. in keinem Falle einen Schutz gegen den Glykogenverlust durch Dinitroph. bietet. Bei der Vorbehandlung mit 25 mg Asc. und nachfolgender Zufuhr von 2,5 mg/100 g Dinitroph. ist der Glykogenschwund in der Leber sogar stärker als bei alleiniger Dinitroph.-Zufuhr.

Auch beim Pervitin fehlt jeder Einfluß der Ask. auf seine glykogensenkende Wirkung in der Leber.

1,2,4-α-Dinitrophenol nach Vorbehandlung mit Desoxycorticosteronacetat.

Bei der Vorbehandlung mit DCA. erhielten die Tiere 2 bzw. 4 mg/Tier Cortiron am Versuchstage sowie 1 und 3 Tage zuvor subkutan injiziert. Der kleineren DCA.-Dosis entsprechend wurde auch die kleinere Dinitroph.-Dosis benutzt. Umgekehrt erhielten die Tiere, die mit hohen DCA.-Dosen vorbehandelt waren, nachträglich auch die höhere Dinitroph.-Dosis von 2,5/mg 100 g.

Es läßt sich demnach durch eine alleinige Vorbehandlung mit DCA. eine Gegenwirkung gegen den durch 1,0 mg/100 g Dinitroph. verursachten

* 3tägige Vorbehandlung.

Tabelle 5. *Der Einfluß von Desoxycorticosteronacetat auf 1,2,4-α-Dinitrophenol.* Glykogengehalt in %.

Cortiron-Dosis mg/Tier	Dinitroph.-Dosis mg/100 g	Leber	Mittelwert	Muskel	Mittelwert
2,0	1,0	3,60 4,40 2,57 1,60 1,25 3,45 2,25 2,05 2,55	**2,64** ± 0,33	0,72 0,45 0,61 0,47 0,38 0,59 0,40 0,61 0,32	**0,51** ± 0,05
4,0	2,5	1,46 1,43 2,04 1,71 1,70 1,76 1,63 1,69	**1,69** ± 0,07	0,22 0,22 0,33 0,36 0,30 0,35 0,34 0,26	0,30 ± 0,03

Glykogenverlust in Leber und Muskulatur erzielen. Beim Leberglykogen bewegt sich die Zunahme allerdings noch unterhalb der normalen Schwankungsbreite. Andererseits liegt das Glykogen nach der Vorbehandlung mit DCA. in der Leber deutlich höher als bei den Tieren, die nur Dinitroph. ohne die vorangehende Zufuhr von DCA. erhielten. Die Unterschiede im Leberglykogengehalt sind genügend groß, um auch bei einer statistischen Auswertung sich als reell zu erweisen. In der Muskulatur wurden sogar normale Glykogenwerte nach der Vorbehandlung mit Rindenhormon nachgewiesen.

Bei der höheren Dinitroph.-Dosis von 2,5 mg/100 g versagt der DCA.-Schutz, selbst wenn eine Dosis von 4,0 mg/Tier zugeführt wird. Dies gilt für die Leber wie auch für die Muskulatur. Das DCA. vermag somit nur in begrenztem Umfang einen Schutz gegen den glykogensenkenden Einfluß des Dinitroph. zu geben.

1,2,4-α-Dinitrophenol und Pervitin nach kombinierter Vorbehandlung mit Askorbinsäure und Desoxycorticosteronacetat.

In weiteren Versuchsreihen wurde Ask. gleichzeitig in Kombination mit DCA. in der Vorbehandlungsperiode injiziert. Für jede der benutzten Dinitroph.-Dosen wurde hierbei eine Versuchsreihe mit einer kleineren DCA.-Gabe (2,0 mg/Tier) in Kombination mit 10 mg/100 g angesetzt. Außerdem wurde eine zweite Versuchsreihe durchgeführt, in der 10 mg/100 g Ask. mit 4 mg/Tier DCA. gleichzeitig verabreicht wurden. Bei all diesen Untersuchungen bestand die Vorbehandlung in einer 3tägigen Zufuhr dieser beiden Substanzen, und zwar wiederum am Versuchstage selbst und 3 Tage sowie 1 Tag zuvor.

In gleicher Weise wurden beim Pervitin zwei Untersuchungsreihen ausgeführt, bei denen die Tiere 10 mg/100 g Ask. in Kombination mit 2 bzw. 4 mg/Tier DCA. an 3 Vorbehandlungstagen erhielten.

Bei der Benutzung der Dinitroph.-Dosis von 1 mg/100 g zeigt sich entsprechend den Befunden bei alleiniger Vorbehandlung von Rindenhormon, daß auch die Kombination von Ask. und DCA. den Glykogenabfall in

Tabelle 6. *Der Einfluß von Desoxycorticosteronacetat und Askorbinsäure auf 1,2,4-α-Dinitrophenol bzw. Pervitin.* Glykogengehalt in %.

Asc.-Dosis mg/100g	Cortiron-Dosis mg/Tier	Dinitroph.-Dosis mg/100 g	Leber	Mittelwert	Muskel	Mittelwert
10,0	2,0	1,0	2,36 1,99 2,16 2,53 4,62 2,27 3,62 2,55 1,90 4,34	**2,84** ± 0,31	0,27 0,28 0,45 0,36 0,63 0,36 0,62 0,29 0,36 0,51	**0,41** ± 0,05
10,0	4,0	1,0	2,55 2,10 2,55 2,35 2,60	**2,43** ± 0,10	0,43 0,42 0,50 0,57 0,60	**0,50** ± 0,04
10,0	2,0	2,5	2,32 2,22 1,65 1,83 1,60 1,92	**1,92** ± 0,11	0,32 0,31 0,25 0,21 0,23 0,19	**0,25** ± 0,05
10,0	4,0	2,5	1,95 1,89 3,07 2,78 3,07 2,00 2,17 2,26	**2,40** ± 0,19	0,44 0,42 0,33 0,44 0,28 0,36 0,32 0,36	**0,36** ± 0,02
		Pervitin				
10,0	2,0	1,0	2,82 1,45 1,93 1,80 2,25 2,50	**2,13** ± 0,20	0,36 0,27 0,32 0,27 0,30 0,49	**0,33** ± 0,03
10,0	4,0	1,0	2,86 2,23 1,97 3,13 2,08	**2,45** ± 0,24	0,46 0,41 0,43 0,38 0,45	**0,43** ± 0,02

Leber und Muskulatur abzuschwächen vermag. Hierbei wird die Stärke der Glykogenzunahme durch die Zulage von Ask. zum DCA. anscheinend nicht beeinflußt. Bei der Muskulatur liegen die erzielten Resultate sogar eher ungünstiger als in der Vergleichsreihe mit alleiniger Vorbehandlung der gleichen DCA.-Dosis. Absolute Abweichungen lassen sich aber nicht nachweisen.

Auch die Steigerung der DCA.-Gabe von 2 auf 4 mg/Tier ist trotz der Zulage von Ask. für die Höhe des Glykogenanstiegs in Leber und Muskulatur nicht von wesentlicher Bedeutung. Die Glykogenwerte fallen nahezu gleichwertig aus.

Ein Anstieg der DCA.-Wirkung bei der Zugabe von Ask. zeigt sich in den Versuchen mit der Dinitroph.-Dosis von 2,5 mg/100 g, indem hier die kombinierte Zufuhr von 10 mg/100 g Asc. und 4 mg/Tier DCA. noch einen deutlichen Schutz des Leber- und Muskelglykogens bewirken, während bei alleiniger Vorbehandlung mit der gleichen DCA.-Dosis der Abfall des Glykogens durch Dinitroph. nicht aufzuhalten ist. Bei der Behandlung der Tiere mit hohen Dinitroph.-Gaben ist somit für die Hemmung des Glykogenabfalls anscheinend die Größe der DCA.-Dosis ausschlaggebend, da bei kleinen DCA.-Gaben selbst bei Zulage von Ask. das Glykogen fast ebenso niedrig wie bei den nicht vorbehandelten Tieren liegt und erst bei hoher DCA.-Dosierung der Glykogenschwund nach Dinitroph. wirksam bekämpft wird.

Beim Pervitin ist selbst die kombinierte Zufuhr von Ask. und DCA. ohne Einfluß auf den Glykogenverlust in der Leber. Die erzielten

Glykogenwerte liegen eindeutig innerhalb der Schwankungsbreite des Glykogengehalts, der bei alleiniger Zufuhr von Pervitin erreicht wird.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Insgesamt läßt sich aus diesen Versuchen entnehmen, daß durch die kombinierte Zufuhr von Ask. mit DCA. in hoher Dosierung der Glykogensturz nach toxischen Gaben von Dinitroph. in Leber und Muskulatur weitgehend verhütet wird. Bei alleiniger Zufuhr von DCA. gewährt dieses nur in beschränktem Umfang einen Schutz für das Leber- und Muskelglykogen.

Tabelle 7. *Der Einfluß von Pernocton und Paraldehyd auf Pervitin.* Glykogengehalt in %.

Pernocton-Dosis mg/100 g	Pervitin-Dosis mg/100 g	Leber	Mittelwert	Muskel	Mittelwert
6,0	1,0	2,60 2,82 2,37 2,54 2,29	**2,52** $\pm$ 0,09	0,53 0,58 0,50 0,58 0,42	**0,52** $\pm$ 0,03
Paraldehyd 100,0	1,0	1,77 2,16 1,72	1,88 $\pm$ 0,15	0,38 0,47 0,25	**0,37** $\pm$ 0,07

Infolgedessen ist die Gegenwirkung nur bei der Zufuhr mittlerer Dinitroph.-Dosen nachzuweisen, und mit einer Steigerung der Dinitroph.-Gabe auf toxische Dosen verschwindet sie.

Demgegenüber übt die gleiche Vorbehandlung der Tiere beim Pervetin keine Schutzwirkung aus. Einige orientierende Versuche zeigten außerdem, daß auch eine Vorbehandlung der Tiere mit zentral lähmenden Stoffen die glykogenmindernde Wirkung des Pervitins nicht aufzuhalten vermag.

Diese Versuche haben allerdings nur bedingt Wert, da nicht näher geprüft wurde, inwieweit die benutzten Narkotika selbst den Glykogengehalt der inneren Organe beeinflussen *.

Bei den Versuchen an der Ratte erhielten die Tiere Pernocton bzw. Paraldehyd subkutan in Überseitenlagendosis zu 6,0 mg/100 g bzw. 100 mg/100 g. Nach Eintritt der Seitenlage wurde Pervitin in einer Dosis von 1,0 mg/100 g subkutan injiziert.

* Versuche mit Paraldehyd von Kohleick[60] zeigen, daß Paraldehyd im Schwimmversuch am Frosch erst in unmittelbarer Nähe der letalen Gaben den Glykogenbestand von Leber und Muskel angreift. In Reihenversuchen mit je 6 Tieren ließ sich nachweisen, daß erst bei der Dosierung von 4,0 g für 300 ccm Wasser das Glykogen in Leber und Muskel eindeutig unter die Norm absinkt, während im Herzen bereits bei einer Dosierung von 3,0/300 ccm Wasser eine statistisch gesicherte Minderung des Glykogengehalts eintritt. Die letalen Dosen wurden ebenfalls in Reihenversuchen an 6 Tieren mit 4,25 g/300 ccm bestimmt. Für die Senkung des Glykogens in der Leber und Muskulatur wurden somit 94% der letalen Dosen und am Herzen 70% der letalen Dosis benötigt.

[60] Kohleick: Diss. Leipzig 1943.

Die Seitenlagendosis liegt beim Paraldehyd nach TUNGER[61] bei 60 mg/100 g. In früheren Untersuchungen[62] wurden 70 mg/100 g als seitenlagenwirksam ermittelt. Beim Pernocton geben TUNGER[61] und TOBERENTZ[63] 4 mg/100 g als Seitenlagendosis an. Die gleiche Dosis war auch in den eigenen Versuchen wirksam. Nach VON NYARY[64] bewirken 5 mg/100 g Pernocton Seitenlage und nach VOGT[65] kommt es sogar erst bei 6,8 mg/100 g zum Eintritt der Seitenlage.

Die letalen Dosen liegen bei Paraldehyd nach TUNGER und eigenen Bestimmungen bei 165 mg/100 g. Bei Pernocton schwanken die Angaben für die letalen Dosen bei den angeführten Autoren zwischen 6 und 9 mg/100 g. Es läßt sich unter Berücksichtigung der am Frosch von KOHLEICK erzielten Ergebnisse annehmen, daß auch an der Ratte mit der Einhaltung eines bestimmten Abstandes von der letalen Dosis beim Paraldehyd keine stärkere Beeinflussung des Glykogenbestandes in den inneren Organen befürchtet werden muß.

II. Glykogenphosphorylierung in Leber und Muskulatur.

Nach den Untersuchungen von VERZÁR[56] ist die Wirkung des Rindenhormons in erster Linie auf eine Beseitigung gestörter Phosphorylierungsprozesse gerichtet. Es lag daher nahe, in dieser Richtung die erzielten Ergebnisse weiter auszubauen, um eventuell weitere Anhaltspunkte über das verschiedenartige Verhalten der Rindenhormonvorbehandlung bei der Pervitin- und Dinitroph.-Vergiftung zu erhalten bzw. für die Klärung des Wirkungsmechanismus beider Stoffe neue Gesichtspunkte zu gewinnen.

Methodik.

Die Bestimmung der Glykogenphosphorylierung erfolgte nach der von SCHUMANN[66] ausgearbeiteten Methode. In gleicher Versuchsanordnung haben auch KUTSCHER und WÜST[67] sowie MONTIGELL und VERZÁR[68] den Ablauf der Phosphorylierungsvorgänge in Muskel, Leber und Herz bei verschiedenen Tierarten bestimmt. Hierbei werden Muskel bzw. Leber in Mengen von 0,5 g nach dem Zermahlen in eine Lösung von 2 ccm Natriumfluorid-Natriumbikarbonat-Pufferlösung gebracht, die 0,25% Glykogen enthält. Sogleich und nach Ablauf einer Stunde wird der Gehalt an freiem organischen Phosphat im eiweißfreien Trichloressigsäurefiltrat bestimmt, und zwar nach der Methode von FISKE und SUBBAROW[69] in der

[61] TUNGER: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **160**, 74 (1931). — [62] GROS u. HAAS: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **182**, 348 (1936). — [63] TOBERENTZ: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **171**, 346 (1933). — [64] v. NYARY: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **165**, 504 (1932). — [65] VOGT: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **152**, 341 (1930). — [66] SCHUMANN: Pflügers Arch. **243**, 686 (1940). — [67] KUTSCHER u. WÜST: Naturw. **29**, 314 (1941). — Hoppe-Seylers Z. **273**, 235 (1942). — [68] MONTIGELL u. VERZÁR: Helvet. physiol. Acta **1**, 115 (1943). — [69] FISKE u. SUBBAROW: J. biol. Chem. **66**, 375 (1925).

Modifikation von Lohmann und Jendrassik[70]. Zur Messung im Kolorimeter diente das lichtelektrische Kolorimeter von Havemann, nachdem in Vorversuchen mit trichloressigsäurehaltigen Phosphatlösungen bekannter Konzentration eine Eichkurve angelegt war, die einen linearen Anstieg der Kurve bei zunehmendem Phosphatgehalt zeigte.

Bei der Untersuchung der Leberstückchen wurde darauf geachtet, daß zu den Phosphatbestimmungen sofort nach der Entnahme der Leber bzw. 1 Stunde nach der Entnahme stets der gleiche Leberlappen benutzt wurde. In den Muskelversuchen wurden jeweils Muskeln der gleichen Extremität für beide Bestimmungen verwandt. In Anbetracht der geringen Muskelmengen mußten wir bei den Ratten neben Teilen vom Gastrocnemius auch Teile der zugehörigen Oberschenkelmuskulatur benutzen. Um etwa vorhandene Unterschiede im Phosphorylierungsvermögen bei den verschiedenen Muskelpartien auszugleichen, wurde die Bestimmung des Phosphatgehalts sofort nach der Entnahme der Muskeln abwechselnd an Teilen aus der Oberschenkelmuskulatur bzw. vom Gastrocnemius vorgenommen. Entsprechend standen daher für die Bestimmung nach einstündigem Aufenthalt in der glykogenhaltigen Natriumfluoridlösung abwechselnd Anteile der Ober- bzw. Unterschenkelmuskulatur zur Verfügung.

In den Tabellen ist jeweils die prozentuale Abnahme des ursprünglich vorhandenen Phosphats angegeben. Die absoluten Mengen sind bei den verschiedenen Tieren in Muskel und Leber stark wechselnd. Die Abnahme in Prozenten vermag daher den Verlauf des Prozesses besser auszudrücken als die absoluten Werte. Eine Abnahme des anorganischen Phosphats bedeutet jeweils die Phosphorylierung des Glykogens, da durch die Zugabe des Natriumfluorids eine Abgabe des Phosphats aus der organischen Bindung auf der Stufe der Triosephosphorsäure verhindert wird.

Kontrollversuche.

Die 17 Bestimmungen an verschiedenen Leberproben ergaben eine Phosphatabnahme zwischen 38,2 und 62,7% in 1 Stunde. Der Mittelwert liegt bei 51,9%. Schwankungen um etwa 20% nach oben und unten liegen noch innerhalb der Norm.

Am Muskel beträgt die Abnahme des Phosphats im gleichen Zeitraum bei 19 Einzelbestimmungen 45,4—86,6%. Hieraus berechnet sich eine durchschnittliche Verminderung des Phosphatgehalts von 65,1%. Die Schwankungsbreite ist hier noch größer, da Abweichungen bis zu etwa 30% beobachtet wurden.

Die am gleichen Tier durchgeführten Bestimmungen zeigen, daß die Phosphatwerte im allgemeinen recht gut beieinander liegen. Auch die Abnahme des Phosphats innerhalb von 1 Stunde stimmt beim gleichen Tier

[70] Lohmann u. Jendrassik: Biochem. Z. 178, 419 (1926).

mit den vergleichsweise geprüften Leberstückchen bzw. der Muskulatur beider Extremitäten zumeist gut überein.

Tabelle 8. *Glykogenphosphorylierung bei normalen Ratten.*

Nr.	Leber Phosphatgehalt in mg-%			Muskel Phosphatgehalt in mg-%		
	Nach Entnahme	Nach 1 Std.	Abnahme in %	Nach Entnahme	Nach 1 Std.	Abnahme in %
1	86	42	51,4	134	25	81,4
2	132	50	62,1	105	51	51,5
3	96	38	60,4	129	19	85,2
	118	44	62,7	134	18	86,6
4	86	33	61,4	114	24	78,9
	86	38	55,8	115	54	53,1
5	112	50	55,4	117	36	69,2
	120	48	60,0	117	40	65,8
6	148	72	51,3	129	51	60,2
	150	62	58,7	140	56	60,0
7	84	52	38,2	109	49	55,1
	92	52	43,5	117	45	61,5
8				139	52	62,6
9				174	40	77,1
21	122	70	42,7	130	49	62,3
22	122	62	44,2	134	51	62,6
23	123	72	41,5	141	55	61,0
24	118	70	41,5	122	53	56,6
25	152	82	46,1	141	77	45,4
		Mittelwert	**51,9** $\pm$ 2,2			**65,1** $\pm$ 2,7

1,2,4-α-Dinitrophenol und Pervitin.

Die Zufuhr des Dinitroph. erfolgte in 2%iger Lösung subkutan in einer Dosierung von 2,5 mg/100 g. 2 Stunden nach der Injektion wurden die Tiere getötet und der Ablauf der Phosphorylierungsvorgänge bestimmt.

Ebenso erhielten die Ratten Pervitin subkutan in einer Dosis von 1 mg/100 g. Auch hier war die Einwirkungsdauer auf 2 Stunden beschränkt.

Nach der Zufuhr des Dinitroph. ist die Glykogenphosphorylierung in der Mehrzahl der Fälle deutlich gehemmt. Bei einzelnen Tieren liegen die Werte noch an der unteren Grenze der normalen Schwankungsbreite. Im Durchschnitt werden aber die Normalwerte nicht erreicht, so daß sich als Mittelwert für die Leber eine Abnahme des Phosphatgehalts nach einstündigem Aufenthalt in der glykogenhaltigen Fluoridlösung von 27,6% und für den Muskel entsprechend von 18,2% berechnet. Bei der statistischen Auswertung dieser Ergebnisse bestätigt sich eindeutig, daß Dinitroph. die Glykogenphosphorylierung zu hemmen vermag.

Tabelle 9. *Glykogenphosphorylierung nach Zufuhr von 1,2,4-α-Dinitrophenol und Pervitin.*

Nr.	Dinitrophenol-Dosis mg/100 g	Leber Phosphatgehalt in mg-% Nach Entnahme	Nach 1 Std.	Abnahme in %	Muskel Phosphatgehalt in mg-% Nach Entnahme	Nach 1 Std.	Abnahme in %
10	2,5	122	91	24,2	185	182	1,6
		121	81	32,5	196	160	20,0
11		147	97	36,1	194	157	17,4
		155	91	41,3	188	179	5,8
12		80	50	37,5	94	71	21,1
		77	58	33,8	117	74	38,3
13		108	92	16,4	186	116	37,7
		114	88	22,8	216	128	41,8
14		93	68	24,5	160	146	8,8
		98	70	28,6	150	144	4,0
15		114	92	16,4	152	128	12,7
		116	96	17,3	162	146	8,7
			Mittelwert:	27,6 ± 2,6			18,2 ± 4,1
	Pervitin-Dosis mg/100 g						
16	1	128	72	43,8	132	48	63,5
		124	68	45,1	132	60	54,5
17		126	70	42,9	125	40	68,0
		128	68	46,9	128	43	66,4
18		156	83	46,8	113	37	67,2
		176	70	60,1	109	51	53,2
19		176	78	60,2	128	67	48,7
		182	80	56,1	145	66	54,5
			Mittelwert:	50,1 ± 2,6			58,6 ± 2,5

Nach der Zufuhr toxischer Pervitingaben beträgt die Phosphatabnahme in der Leber zwischen 42,9—60,2% und in der Muskulatur zwischen 48,7 bis 68,0%. Diese Werte liegen noch deutlich innerhalb der gleichen Größenordnung, wie sie bei unbehandelten Tieren gefunden wurde. Das Pervitin bewirkt somit keine Änderung im Ablauf der Phosphorylierungsvorgänge. Die statistische Auswertung zeigt entsprechend, daß reell zu wertende Unterschiede gegenüber der Norm nicht bestehen.

Beim Dinitroph. wurden außerdem einige Versuche in vitro angesetzt. Hierbei wurde den Muskel- bzw. Leberstückchen nach ihrer Entnahme jeweils 1 ccm 0,1%iges Dinitroph. zugefügt. Das entspricht etwa einer Konzentration von 1:3500. Es handelt sich somit bei den Versuchen in vitro um höhere Konzentrationsbereiche als bei den in vivo benutzten, die sich etwa auf 1:40000 bis 1:100000 berechnen. Auch bei dieser Versuchsanordnung zeigte sich eine deutliche Hemmung der Phosphorylierungsvorgänge. Um das verschiedenartige Verhalten am unbehandelten normalen

Tabelle 10. *Glykogenphosphorylierung mit und ohne Zusatz von 1,2,4-α-Dinitrophenol in vitro.*

Nr.	Ohne Zusatz von Dinitrophenol Phosphatgehalt in mg-%			Bei Zusatz von 1 ccm 0,1%igem Dinitrophenol Phosphatgehalt in mg-%		
	Nach Entnahme	Nach 1 Std.	Abnahme in %	Nach Entnahme	Nach 1 Std.	Abnahme in %
			Leber.			
21	122	70	42,7	152	134	10,7
22	122	62	44,2	154	124	17,3
23	122	72	41,5	126	124	1,6
24	118	70	41,5	134	126	5,7
25	152	82	46,1	174	162	6,9
		Mittelwert:	43,2 ± 1,4			8,4 ± 2,6
			Muskel.			
21	130	49	62,3	130	71	45,4
22	134	51	62,6	134	78	40,0
23	141	55	61,0	130	65	50,0
24	122	53	56,6	119	75	37,5
25	141	77	45,4	139	114	18,6
		Mittelwert:	57,6 ± 4,3			38,3 ± 5,3

Organ und nach Zusatz von Dinitroph. besser zu verdeutlichen, wurde in dieser Untersuchungsreihe vergleichsweise nebeneinander am gleichen Tier die Phosphatabnahme mit und ohne Zusatz von Dinitroph. bestimmt. Die Gegenüberstellung in der Tabelle zeigt deutlich das verschiedenartige Verhalten unter diesen beiden Versuchsbedingungen. Für die Messung des Phosphatgehalts im Kolorimeter erwies sich als günstig, daß die Eigenfarbe des Dinitroph. beim Zusatz der Trichloressigsäure zur Eiweißfällung verschwand und so keine störende Farbbeimengung bei der kolorimetrischen Bestimmung zu berücksichtigen war.

1,2,4-α-Dinitrophenol nach Vorbehandlung mit Desoxycorticosteronacetat bzw. bei kombinierter Zufuhr von Askorbinsäure und Desoxycorticosteronacetat.

Es blieb schließlich noch zu prüfen, wie sich ein Vorbehandeln der Tiere mit Nebennierenrindenhormon bzw. Ask. und Rindenhormon auf die Hemmung der Phosphorylierungsvorgänge durch Dinitroph. auswirkt. Zu diesem Zwecke erhielten die Tiere 3 Tage 4 mg/Tier DCA. subkutan, und zwar am 3. bzw. 1. Tag vor dem eigentlichen Versuch und am Versuchstage selbst. Bei der zusätzlichen Behandlung mit Ask. wurden gleichzeitig jeweils 10 mg/100 g Ask. zugefügt. Das Dinitroph. wurde ebenfalls subcutan gespritzt in einer Dosis von 2,5 mg/100 g, und zwar unmittelbar im Anschluß an die letzte Vorbehandlung mit dem Rindenhormon.

Bei alleiniger Vorbehandlung mit DCA. ist bereits eine deutliche Beeinflussung für die Störung der Phosphorylierungsvorgänge in der Muskulatur nachzuweisen. In der Leber ist dagegen der Effekt des DCA. nicht

Tabelle 11. *Glykogenphosphorylierung nach Zufuhr von Dinitrophenol und Vorbehandlung mit Nebennierenrindenhormon und Askorbinsäure.*

Nr.	Cortiron-Dosis mg/Tier	Askorbinsäure-Dosis mg/100 g	Dinitrophenol-Dosis mg/100 g	Leber Phosphatgehalt in mg-% Nach Entnahme	Leber Nach 1 Std.	Leber Abnahme in %	Muskel Phosphatgehalt in mg-% Nach Entnahme	Muskel Nach 1 Std.	Muskel Abnahme in %
Vorbehandlung: Nebennierenrindenhormon.									
26	4,0		2,5	126	85	33,4	178	141	19,5
				124	80	35,5	179	139	27,4
27				116	87	25,0	151	111	26,4
				117	85	27,3	168	118	29,8
28				142	101	28,9	178	98	45,0
				142	106	23,4	179	105	41,4
29				149	108	27,5	205	152	25,9
				163	114	31,3	210	154	26,7
30				130	96	26,2	166	99	46,5
				142	105	26,1	184	113	38,6
31				123	93	25,2	143	102	28,7
				127	110	29.3	147	101	31.3
				Mittelwert:		**28,3 ± 1,0**			**32,3 ± 2,5**
Vorbehandlung: Nebennierenrindenhormon + Askorbinsäure.									
32	4,0	10,0	2,5	166	56	66,3	62	30	52,6
				172	52	69,8	74	36	51,3
33				132	61	54,5	92	55	40,1
				136	76	44,1	82	43	47,6
34				105	74	29,5	109	80	26,6
				109	74	32,1	108	81	25,0
35				106	61	42,5	98	66	32,6
				107	56	47,7	102	67	34,6
36				119	99	17,6	165	80	51,5
				129	101	22,2	175	102	41,7
37				122	103	18,7	168	93	50,7
				130	109	16,2	172	95	44,9
38				128	100	23,4	192	123	35,4
				126	102	20,7	200	126	37,0
39				141	90	36,2	183	103	44,4
				140	96	31,4	181	104	42,6
40				174	124	28,7	196	103	47,1
				168	120	33,4	192	103	46,1
41				188	125	33,5	217	110	49,5
				187	113	39,6	227	116	48,9
				Mittelwert:		**35,4 ± 3,5**			**42,4 ± 1,8**

erheblich. Werden dagegen Ask. und DCA. gleichzeitig zugeführt, so ergibt sich auch in diesem Falle wieder eine deutliche Zunahme der Gegenwirkung, so daß die Phosphorylierungsfähigkeit wesentlich gesteigert wird. Es wird

aber auch unter diesen Bedingungen keine völlige Angleichung an die Norm erreicht. Andererseits sind die Unterschiede gegenüber den Werten bei alleiniger Zufuhr von Dinitroph. genügend groß, um einen Einfluß der Vorbehandlung sicher festzulegen. Die Kombination des Nebennierenrindenhormons mit Ask. bewährt sich demnach auch bei der Beseitigung von Phosphorylierungsstörungen und sie erweist sich der Zufuhr des Nebennierenrindenhormons ohne Zugabe von Ask. auch in dieser Richtung wesentlich überlegen.

Besprechung der Ergebnisse.

Nach den vorliegenden Versuchen ist die Wirkung des Dinitroph. auf den Kohlehydrathaushalt mit einer Änderung der Phosphorylierungsprozesse verknüpft, die nach der Zufuhr von Dinitroph. gegenüber der Norm deutlich an Intensität, und zwar besonders in der Leber abnehmen. Eine Störung der Phosphorylierung bedeutet eine verminderte Resynthese von Glykogen und möglicherweise eine Hemmung der Kohlehydrat- und Fettresorption im Darm. Wahrscheinlich ist bei der Hemmung der Phosphorylierungsvorgänge auch der Abbau der Kohlehydrate ähnlich wie ihr Aufbau betroffen, denn es handelt sich dabei nach unseren heutigen Anschauungen um einen Kreisprozeß mit den gleichen Zwischenstufen. Es braucht demnach anscheinend die Steigerung der Oxydationsvorgänge mit den Phosphorylierungsprozessen nicht zwangsläufig gekoppelt zu sein.

Der Nachweis der Phosphorylierungsstörung durch Dinitroph. bietet einen weiteren Einblick in den Wirkungsmechanismus dieses stoffwechselschädigenden Giftes, und er ergibt zugleich eine gewisse Erklärung für die Minderung des Glykogenbestandes in Leber und Muskulatur nach der Dinitroph.-Zufuhr. Es erscheint allerdings zweifelhaft, ob die Schädigung der Phosphorylierungsvorgänge den primären und entscheidenden Faktor im Ablauf des Vergiftungsbildes bildet. Wir möchten eher die Auffassung vertreten, daß die ausschlaggebende Wirkungskomponente in einer Änderung der Oxydationsvorgänge in der Zelle zu suchen ist, so daß die Phosphorylierungsvorgänge nur als ein sekundärer Faktor zu werten sind, der allerdings für die weitere Ausbildung des Vergiftungsbildes nicht unwesentlich ist.

Die Abnahme der Phosphorylierung in Muskel und Leber durch Dinitroph. läßt auch die Gegenwirkung des Nebennierenrindenhormons verständlich erscheinen, da dieses Hormon bekanntlich zu einer bedeutenden Steigerung der Phosphorylierungsprozesse führt. Es ließ sich daher auch nachweisen, daß die durch Dinitroph. gestörten Vorgänge in der Muskulatur nach der Vorbehandlung der Tiere mit DCA. gebessert werden. Damit erklärt sich zugleich der günstige Einfluß des Rindenhormons auf den Glykogenverlust nach Dinitroph.-Zufuhr.

Die Gegenwirkung des Rindenhormons erfährt eine deutliche Steigerung bei gleichzeitiger Zufuhr von Ask. Dies gilt für die Beeinflussung der

Glykogenverluste in Leber und Muskulatur nach Dinitroph.-Injektion wie auch für die Beseitigung der gestörten Phosphorylierung in beiden Organen. Die Ask. verstärkt somit den Einfluß des Rindenhormons an einer Stelle, die als wesentliche Wirkungskomponente des Hormons angesehen wird. Für die häufig vertretene Auffassung, daß aus der Kombination von Ask. mit Rindenhormon besonders günstige therapeutische Effekte entstehen, ergibt sich dabei als neuer Gesichtspunkt, daß durch die Zulage der Ask. zum Rindenhormon auch die Phosphorylierungsvorgänge stärker gefördert werden als bei ausschließlicher Verwendung des Hormons.

Beim Pervitin, bei dem ein Einfluß auf die Phosphorylierungsvorgänge nicht festgestellt werden konnte, fehlt dementsprechend jede andere Gegenwirkung des Rindenhormons selbst bei der Kombination mit Ask. Die Abnahme des Glykogenbestandes in der Leber stellt sich daher nach der Vorbehandlung der Tiere in gleichem Ausmaße ein, wie sie bei der Zufuhr des Pervitins allein zur Beobachtung kommt.

Ob dieses gleichartige Verhalten in der DCA.-Wirkung auf die Schädigung des Glykogenbestandes und der Phosphorylierungsprozesse durch Dinitroph. bzw. das Fehlen beider Vorgänge bei der Pervitinvergiftung bedeutet, daß hier gewisse allgemein geltende Zusammenhänge aufgedeckt sind und auch in anderen Fällen ähnliche Bedingungen für die Leberschutzwirkung des Rindenhormons bzw. für ihr Versagen gelten, das kann nur in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Bei einigen orientierenden Versuchen mit Thyroxin ergab sich, daß auch dieses Hormon die Phosphorylierungsvorgänge in der Leber und Muskulatur stört und herabsetzt. Diese Beobachtung scheint deshalb wichtig, weil das Thyroxin ebenso wie Dinitroph. eine Senkung des Glykogens in Leber und Muskulatur bewirkt. Außerdem läßt sich beim Thyroxin der Glykogenverlust durch eine Vorbehandlung der Tiere mit Ask.[11, 21, 24] bzw. DCA.[24, 48] weitgehend verhindern. Hier ergibt sich demnach ein ähnliches Verhalten wie beim Dinitroph. Auch hinsichtlich des antagonistischen Einflusses der Ask. auf den Temperaturanstieg nach Thyroxinzufuhr bestehen deutliche Parallelen zum Dinitroph.; indem nur bei diesen beiden Giften die Ask. im Gegensatz zu mehreren anderen Substanzen eine Gegenwirkung im Sinne einer Abschwächung des Fiebers bewirkt[55]. Es bestehen somit recht erhebliche Übereinstimmungen, die auf das Vorliegen ähnlicher oder gleichartiger Störungen in den peripheren Organen beim Thyroxin und Dinitroph. hinzuweisen scheinen und die die Bedeutung der Phosphorylierungsvorgänge bei diesen beiden Vergiftungszuständen unterstreichen.

Zusammenfassung.

Toxische Dosen von 1,2,4-α-Dinitrophenol bewirken eine Abnahme des Glykogens in Leber und Muskulatur. Gleichzeitig besteht eine Minderung

der Phosphorylierungsprozesse in diesen Organen, die sich in vivo und vitro nachweisen ließ.

Beim Pervitin wird nach der Zufuhr toxischer Gaben nur der Glykogenbestand in der Leber gesenkt, das Muskelglykogen wird dagegen nicht beeinflußt. Auch der Ablauf der Phosphorylierungsvorgänge wird nicht betroffen.

Die Vorbehandlung der Tiere mit Askorbinsäure in mittleren Dosen vermag die Abnahme des Glykogens nach Dinitrophenol- und Pervitinzufuhr nicht zu beeinflussen. Die Askorbinsäure selbst verändert in mittleren Dosen den Glykogenbestand von Leber und Muskel nicht. In hohen Gaben löst sie dagegen eine Minderung des Glykogenbestandes in der Leber aus.

Die Vorbehandlung mit Desoxycorticosteronacetat vermag in begrenztem Umfang einen Schutz gegen Dinitrophenol zu bieten, da es die Glykogensenkung nach Dinitrophenol in mittleren Dosen teilweise behebt.

Bei der Kombination von Desoxycorticosteronacetat mit Askorbinsäure nimmt die Gegenwirkung auf den glykogensenkenden Einfluß des Dinitrophenols an Intensität zu. Selbst bei der Zufuhr toxischer Dinitrophenoldosen wird die Senkung des Glykogenbestandes deutlich abgeschwächt.

Entsprechend läßt sich auch ein antagonistischer Einfluß des Desoxycorticosteronacetat auf die Phosphorylierungsstörung durch Dinitrophenol in der Muskulatur feststellen. Die Zulage von Askorbinsäure erzielt auch hierbei eine verstärkte Gegenwirkung, die jetzt auch für die Leber nachweisbar ist.

Beim Pervitin ist dagegen die Vorbehandlung der Tiere mit Desoxycorticosteronacetat selbst in der Kombination mit Askorbinsäure für die Senkung des Glykogenbestandes in der Leber bedeutungslos. Ebenso läßt sich durch eine Vorbehandlung der Tiere mit Paraldehyd und Pernocton keine Änderung des glykogensenkenden Einflusses toxischer Pervitingaben erzielen.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Studien über Methämoglobinbildung.

XXVIII. Mitteilung.

Dinitrotolylhydroxylamin.

Von

Elisabeth Haas.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 21. Juni 1944.)

Im Laufe von Untersuchungen zur Aufklärung der Gründe für die verschiedene Intensität der Methämoglobin- (= Hämiglobin-) Bildung durch substituierte aromatische Nitroverbindungen[1] haben Schlimme und Herken[2] ermittelt, daß sowohl die Methylsubstitution in o-, m- oder p-Stellung, wie die Nitrosubstitution in m-Stellung die Wirkung des Phenylhydroxylamins auf den Blutfarbstoff abschwächen, wenn auch nicht sehr bedeutend. Ein Unterschied ließ sich jedoch darin erkennen, daß der *Ablauf* der Reaktion bei der Nitrosubstitution verzögert war, und zwar sowohl die Erreichung des Maximums der Umwandlung wie besonders die Rückkehr zur Norm. Bei der Kombination von Methylierung mit Nitrierung fand Herken beim m-Nitro-p-tolylhydroxylamin keinen Unterschied gegenüber m-Nitrophenylhydroxylamin.

Der gewerbehygienisch wichtige große Unterschied in der Blutwirkung zwischen Dinitrobenzol und Trinitrotoluol ließ es erwünscht erscheinen, auch noch das zweifach nitrierte Produkt, also 2,6-Dinitro-4-hydroxylamino-toluol zu untersuchen. Wir erhielten das Präparat dankenswerterweise von Herrn Oberreg.-Rat Dr. Engel aus dem Reichsgesundheitsamt, wo es durch Herrn Dr. Weber hergestellt worden war. Die gelb gefärbte Substanz erwies sich als recht gut haltbar. Die Bestimmung des Hämiglobins wie des Gesamthämoglobins (nach Umwandlung in Hämiglobin) erfolgte mit dem Weka-Kolorimeter nach Havemann[3].

1. Versuche in vitro.

Zur Untersuchung der Substanz an Blutproben wurde sie unter Zusatz unwesentlicher Mengen Azeton zu 0,5 und 1% in Olivenöl gelöst. Hämolysiertes Hunde- oder Pferdeblut mit 3—6% Hämoglobin wurde

[1] Bredow, M. v. u. F. Jung: Naunyn-Schmiedebergs Arch. (XXV. Mitt.) **200**, 335 (1942). — [2] Schlimme u. Herken: Naunyn-Schmiedebergs Arch. (XXVI. u. XXVII. Mitt.) **202**, 60 u. 70 (1943). — [3] Havemann, Jung u. v. Issekutz: Biochem. Z. **301**, 116 (1939).

zu je 10 ccm mit 0,5—2 ccm dieser öligen Lösungen durchschüttelt, wobei die Dosis des Dinitrotolylhydroxylamins 5—10 mg betrug. Die Hämiglobinbestimmungen erfolgten jede zweite oder jede Minute; es zeigte sich, daß die Umwandlung trotz der heterogenen Phasen in der kurzen Zeit bis zur ersten Bestimmung bereits vollständig war. Ihr Ausmaß ist nicht ganz exakt zu beurteilen, weil das emulgierte Öl die Mischungen trübte, so daß die abgelesene (nach Zusatz von KCN eintretende) Aufhellung im roten Felde nicht als ganz zuverlässiges Maß für Hämiglobin angesehen werden konnte. Bei den geringsten zugesetzten Mengen entsprach die Aufhellung durch Zyanid etwa $^2/_3$ Äquivalent Hämiglobin auf 1 Mol Dinitrotolylhydroxylamin. In weiteren Versuchen wurden gewaschene Rinderblutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung (mit 12—19% Hämoglobin) mit den obenerwähnten Lösungen durchschüttelt, und zwar je 10 ccm mit 1—3 ccm (entsprechend 10—30 mg Dinitrotolylhydroxylamin). Auch dabei zeigte sich eine endgültige Reaktion binnen Minuten. Die gebildete Menge Hämiglobin blieb weiterhin stundenlang konstant. Das Äquivalenzverhältnis zwischen gebildeter Hämiglobinmenge und Dosis konnte auf 0,5—1 geschätzt werden.

2. Versuche an Katzen.

6 Katzen erhielten in 1%iger öliger Lösung je 10 mg je Kilogramm, drei weitere Tiere je 5, 15 und 20 mg. Meist wurde in stündlichen Abständen aus einer Randvene des Ohres Blut entnommen und auf Gesamthämoglobin und Hämiglobin analysiert, ferner die Zahl der Heinz-Körperchen bestimmt. In längeren Abständen wurden auch Erythro- und Leukozyten ausgezählt, ferner das Differentialblutbild untersucht. In einem Versuch wurde die 1. Stunde lang alle 5 Min. Blut entnommen und Hämiglobin bestimmt. Dabei zeigte sich ein steiler Anstieg in den ersten 15 Min., dem später nur noch ein viel langsamerer folgte. Das Maximum an Hämiglobin wurde mit 5 mg nach 1, mit 10 und 15 mg nach 1—2, mit 20 mg nach 3 Stunden erreicht. Die Rückbildung des Hämiglobins erfolgte wesentlich langsamer als bei Tolylhydroxylamin (vgl. Schlimme, a. a. O.), glich vielmehr dem bei Nitrophenylhydroxylamin und Mono-Nitrotolylhydroxylamin beobachteten Ablauf (vgl. Herken, a. a. O.). Typische Beispiele sind auf Abb. 1 wiedergegeben. Auf 1 Mol Dinitrotolylhydroxylamin entfielen rund drei Äquivalente Hämiglobin als Maximum der Blutwerte. Die vom Phenylhydroxylamin bekannte Kreisreaktion über ein ungesättigtes Radikal[4] ist also auch hier noch nachweisbar, wenn sie auch zweifellos eine wesentlich langsamere Geschwindigkeit besitzt. Auch noch gegenüber dem Mononitrotolylhydroxylamin (vgl. Herken, a. a. O.) ist das Ausmaß der Umwandlung sehr viel geringer. — Neben der Bildung von Hämiglobin war

[4] Heubner, W.: Erg. Physiol. **43**, 44, 45 (1940). — Jung, F.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **195**, 208 (1940). — Biochem. Z. **304**, 37 (1940).

die von Heinz-Körperchen festzustellen. Sie entwickelten sich wesentlich langsamer als das Hämiglobin und vermehrten sich noch, wenn der Blutfarbstoff wieder zur Norm zurückgekehrt war (vgl. die Abbildungen). An der Erythro- und Leukozytenzahl oder am Differentialblutbild waren keine deutlichen Abweichungen erkennbar. — Trotz dieser anscheinend geringfügigen Einwirkungen war es auffällig, daß alle mit Dinitrotolylhydroxylamin behandelten Tiere starben, obwohl nur eines im Augenblick der Vergiftung (mit 10 mg/kg) sich in einem erkennbar schlechten Zustand befand. Der Tod trat nach 20 mg am 2., nach 15 mg am 4., nach 10 mg je einmal am 3., 4., 6., 7., nach 5 mg am 5. Tage ein. Bei diesem Tatbestand ist es schwer, diese regelmäßigen Todesfälle als zufällig anzusehen. Vielmehr scheint dem Gifte eine zunächst nicht näher analysierte nachhaltige schädliche Gewebswirkung zuzukommen. Allerdings konnten bei der histologischen Durchmusterung der Organe der verendeten Tiere (Leber, Niere, Milz) keine deutlichen pathologischen Veränderungen aufgefunden werden. Daß das untersuchte substituierte Hydroxylamin ebenfalls, wie viele andere Derivate, unmittelbar das Gewebe angreift, erfuhr ich bei Gelegenheit dieser Untersuchung an meinen Armen und Beinen (an denen ich wegen der sommerlichen Wärme nur kurze Strümpfe trug). Wenige Wochen nach Abschluß der Untersuchung, die mich etwa 1 Monat lang beschäftigte, trat ein akutes juckendes Ekzem auf, das in seiner Erscheinungsform durchaus denen glich, die früher von anderen Untersuchern bei der Beschäftigung mit Phenyl- und Tolylhydroxylaminen beobachtet worden waren, freilich längst nicht deren Intensität und Dauer erreichte.

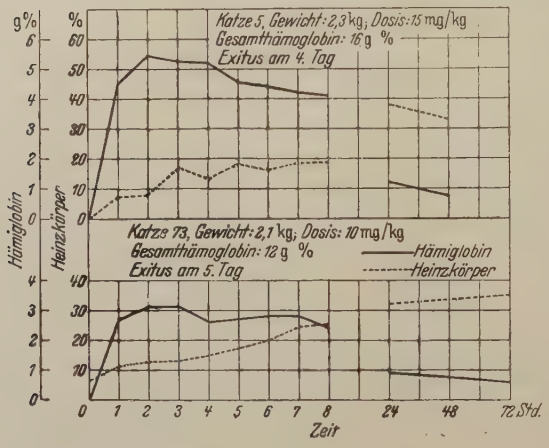


Abb. 1.

Zusammenfassung.

Die Bildung von Hämiglobin (= Methämoglobin) erfolgt durch 3,5-Dinitro-4-Methyl-phenylhydroxylamin in deutlich geringerem Ausmaß als durch Mononitrotolylhydroxylamin, und in noch geringerem als durch Tolylhydroxylamin. Die Rückbildung des Hämiglobins erstreckt sich über viele Stunden. Im Laufe des 1. und 2. Tages vermehrt sich die Zahl der Heinz-Körperchen. Die an Katzen wirksamen Dosen betragen 5—20 mg/kg.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Studien über Methämoglobinbildung.

XXIX. Mitteilung.

Chlor- und Amino-Nitrobenzole.

Von

Fritz Jung,

z. Z. Würzburg.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 21. Juni 1944.)

In einer gemeinsam mit Marguerite v. Bredow[1] durchgeführten Studie war der Einfluß einer zunehmenden Methyl- und Nitrosubstitution auf die physiologische Wirksamkeit (speziell die Hämiglobinbildung) aromatischer Nitroverbindungen untersucht worden. Da auch die Cl- und Aminoderivate der Nitroverbindungen eine gewisse technische und damit gewerbetoxikologische Bedeutung besitzen, war eine Erweiterung der Ergebnisse hinsichtlich der Cl- und Aminosubstitution wünschenswert. Darüber hinaus konnte eine derartige Untersuchung zur Klärung einer von Herken[2] angeschnittenen Frage beitragen, nämlich warum Dinitrobenzol so erheblich giftiger ist als Mononitrobenzol.

Methodisch wurde wie früher[1] verfahren. Die einzelnen Verbindungen (Industriepräparate) wurden intraperitoneal in öliger Lösung appliziert.

I. Chlorderivate.

a) m-Chlornitrobenzol bildet Hämiglobin (Dubachinskaja und Levine[3]). Quantitative Versuche sind allerdings bisher nicht vorgenommen worden. Meine Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Das Maximum der Hämiglobinbildung trat im Durchschnitt nach etwa 10 Stunden auf, bei einem Tiere dauerte es 17, bei zwei anderen nur 3 Stunden. Die Rückbildung des Hämiglobins auf den Ausgangswert war meist nach 40 Stunden beendigt. Das Dosis-Wirkungsverhältnis Äquivalente Hämiglobin zu Mol Nitroverbindung betrug im Durchschnitt 2,3 (maximal 6,0). Die Bildung von Heinz-Körperchen setzte in jedem Versuch einige Stunden nach der Injektion ein, sie führte zu Gebilden von typischer Gestalt und Größe. Vier der Tiere kamen zu Beginn oder während des Versuchs zu Tode. Davon starb nur eines mit Bestimmtheit an der Hämiglobinbildung. Von den 13 Tieren mit Dosen über 7 mg/kg überlebten 2, von den 5 Tieren mit der Dosis 5 mg/kg dagegen 3. Etwa 1 Stunde nach der Injektion kam es bei etwa der Hälfte der Tiere zu Erbrechen, das

Tabelle 1. *Versuche mit m-Chlornitrobenzol* (Mol.-Gew. 157).

Bez. des Tieres	Dosis		Mittlerer Hb-Wert des Tieres in 10^{-2} val je 1 Blut	Hb (3) in		Maximum der Vergiftung nach Std.	HEINZ-Körperchen
	mg/kg	10^{-5} mol/kg		rel. %	10^{-4} val je kg Tier		
1.	10	6,4	0,59	62	2,7	9—26	+
2.	10	6,4	0,34	31	0,8	13	+++
3.	10	6,4	0,61	9	0,4	3	+
4.	10	6,4	0,59	62	2,7	12	+++
5.	10	6,4	0,47	60	2,1	17	+++
6.	10	6,4	0,39	75	2,2	stirbt im Anstieg ?	
7.	10	6,4	0,55	7	0,3	3	(+)
8.	10	6,4	0,26	41	0,8	5	++
9.	10	6,4	0,49	37	1,4	9	+
10.	7,5	4,8	0,65	20	1,0	11	+
11.	7,5	4,8	0,5	56	2,1	9	++++
12.	7,5	4,8	0,5	19	0,7	10	+
13.	7,0	4,5	0,51	70	2,7	11	++++
14.	5,0	3,2	0,55	11	0,5	5—23	+
15.	5,0	3,2	0,65	5	0,2	9	+
16.	5,0	3,2	0,63	34	1,6	12	?

In zwei weiteren Versuchen mit der Dosis 5,0 mg/kg trat keine meßbare Hämiglobinbildung auf (Tier 17 und 18). (Der Hb [3]-Wert wurde unter der Annahme von 75 ccm Blut je Kilogramm Tier berechnet.)

sich mehrere Male wiederholen konnte, oder in Sekretion eines dicken, weißen, in langen Fäden aus dem Mund tropfenden Speichels überging. Die Tiere wurden allmählich immer kraftloser und bekamen sehr weite Pupillen. Einzelne Tiere stöhnten von Zeit zu Zeit. Schließlich kam es zum Exitus ohne irgendwelche auffallende Begleiterscheinung.

Tabelle 2. *Versuche mit Dinitrochlorbenzol* (Mol.-Gew. 202).

Bez. des Tieres	Dosis		Mittlerer Hb-Wert des Tieres in 10^{-2} val je 1 Blut	Hb (3) in		Maximum der Vergiftung nach Std.	HEINZ-Körperchen
	mg/kg	10^{-5} mol/kg		rel. %	10^{-4} val je kg Tier		
19.	40	20	0,5	11	0,4	5	(+)
20.	40	20	0,6	30	1,4	10	++
21.	40	29	0,6	40	1,8	—	+
22.	40	20	0,4	10	0,3	3	+
23.	40	20	0,45	62	2,0	7	—
24.	40	20	1,0	7	0,5	3	+
25.	40	20	0,3	60	1,4	6	+++
26.	40	20	0,6	5	0,2	2	(+)
27.	40	20	0,4	50	1,5	2	?
28.	40	10	0,8	8	0,5	5	—
29.	40	20	0,9	10	0,7	6	+
30.	20	10	0,55	21	0,9	5	—
31.	20	10	0,65	20	1,0	5	—

(Der Hb [3]-Wert wurde unter der Annahme von 75 ccm Blut je Kilogramm Tier berechnet.)

Sehr auffallend war die ungewöhnlich starke Variation hinsichtlich des Ausmaßes der Hämiglobinbildung. Nach Dubachinskaja und Levine[3] läßt sich dies auf die Ernährungsbedingungen zurückführen. Eine eiweißreiche Diät soll die Resistenz gegen Chlornitrobenzol ganz ausgesprochen steigern.

b) 2,4-Dinitrochlorbenzol ist auf seine Hautwirkungen eingehend untersucht (Wells[4], Landsteiner und Chase[5]), weniger dagegen auf seine Eigenschaften als Hämiglobinbildner. Meine Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Das Maximum der Hämiglobinbildung wurde nach 5 Stunden erreicht; bei einem Tier dauerte es bis zu 10, bei zwei anderen nur 2 Stunden. Das

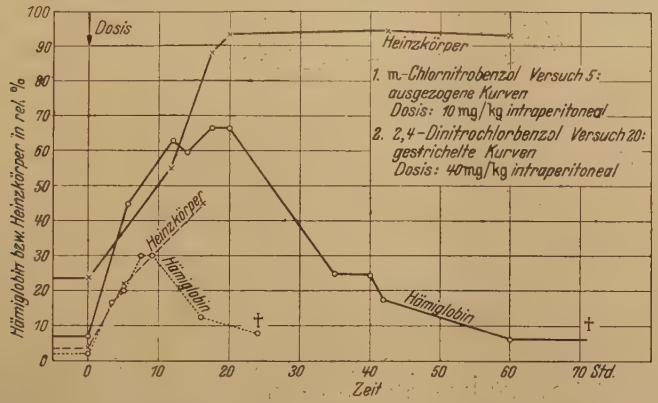


Abb. 1. Katzen, Vergiftung mit m-Chlornitrobenzol und 2,4-Dinitrochlorbenzol.

Dosis-Wirkungsverhältnis betrug im Durchschnitt 0,6 (maximal 1). Die Bildung von Heinz-Körperchen war ausgesprochen mäßig, bei einem Teil der Tiere unterblieb sie völlig. Von den 11 Versuchstieren der Dosis 40 mg/kg überlebten nur 2 länger als 1 Tag. Die objektiven Vergiftungserscheinungen waren außerordentlich geringfügig. Das Tier wurde zunehmend matt und kraftlos, es bekam große Pupillen und starb schließlich. Manchmal war eine kurze vorübergehende Besserung nach Abklingen des Hämiglobins zu beobachten. Auch bei dieser Versuchsreihe variierten die Einzelergebnisse sehr erheblich.

In Abb. 1 ist je ein Versuch mit Chlornitrobenzol und Dinitrochlorbenzol wiedergegeben.

II. m-Nitroanilin.

Die Giftwirkungen des m-Nitroanilins sind eingehend von Wells[4] untersucht worden. Quantitative Angaben über die Hämiglobinbildung gibt er nicht. Meine Versuche sind in Tabelle 3 enthalten. Versuch *H* ist der Arbeit von Herken[2] entnommen und umgerechnet. Das Maximum der

Tabelle 3. *Versuche mit m-Nitroanilin* (Mol.-Gew. 138) *und m-Phenylendiamin* (Mol.-Gew. 108).

Bez. des Tieres	Dosis		Mittlerer Hb-Wert des Tieres in 10^{-2} val je 1 Blut	Hb (3) in		Maximum der Vergiftung nach Std.	HEINZ-Körperchen
	mg/kg	10^{-5} mol/kg		rel. %	10^{-4} Val. je kg Tier		
			Nitroanilin				
32.	11,4	8,3	0,65	53	2,6	4— 9	+++
33.	12	8,7	0,78	50	2,9	4—10	+++
H	?	3,2	?	?	0,95	4— 5	?
			Phenylendiamin				
34.	24	22	0,8	67	4,0	8—24	—
35.	22	20,5	0,7	65	3,4	12	—
36.	22	20,5	0,7	46	2,4	12—26	—
37.	18,5	17	0,82	48	2,9	12—24	—
38.	14,8	13,8	0,68	23	1,2		—
39.	10,7	9,9	0,60	23	1,04	14—44	—

(Der Hb [3]-Wert wurde unter der Annahme von 75 ccm Blut je Kilogramm Tier errechnet.)

Hämiglobinbildung wurde nach etwa 6 Stunden erreicht. Das Dosis-Wirkungsverhältnis lag bei 3. Es wurden typische HEINZ-Körperchen gebildet, die allerdings meist etwas kleiner waren und öfter multipel an der Zelle lagen als beim Dinitrobenzol. Intravitale Hämolyse wurde nicht beobachtet, der Blutfarbstoff sank während der Versuche nicht ab. Die Tiere überlebten die Vergiftung ohne weitere besondere Erscheinungen.

III. m-Phenylendiamin.

Hämiglobinbildung konnte von MEISSNER[6] beim m-Phenylendiamin nicht festgestellt werden. Meine Versuche sind ebenfalls in Tabelle 3 enthalten. Das außerordentlich flache Maximum der Vergiftung wurde nach etwa 12—24 Stunden erreicht. Das Dosis-Wirkungsverhältnis betrug im Durchschnitt 1,4 (maximal 1,8). Der sonstige Ablauf der Phenylendiaminvergiftung bot darüber hinaus Besonderheiten, die zum Teil aus Abb. 2 zu entnehmen sind und an anderer Stelle gesondert behandelt werden. Es kam nicht zu HEINZ-Körperchenbildung, diese nahmen unter Umständen sogar ab; dagegen traten im Blute zahlreiche mit kleinsten Körnchen besetzte Zellen auf, die, wie die elektronenoptische Darstellung aufzeigte, pathologisch veränderte Zellmembranen besaßen. Das Serum wurde hämolytisch, und das Bluthämoglobin nahm schnell und sehr stark ab. — Das m-Phenylendiamin verhält sich somit ähnlich wie sein homologes Toluylendiamin, dessen hämolytische Wirkung seit langer Zeit bekannt ist[7].

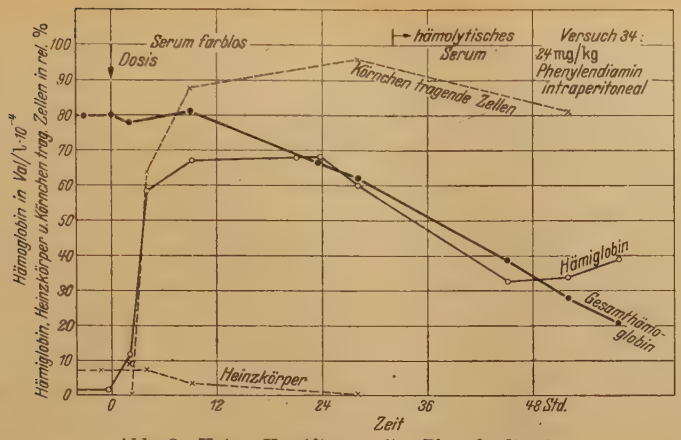


Abb. 2. Katze, Vergiftung mit p-Phenylendiamin.

IV. Besprechung der Ergebnisse.

1. Substitutionsregeln.

Stellt man die obigen Ergebnisse mit einigen früheren Befunden zusammen, so erhält man folgende Tabelle (Versuche an Katzen).

Stoff	Dosis-Wirkungsverhältnis Val. Hb (3) / Mol Stickst.-Verb.	Zeitpunkt des Vergiftungs-Maximums in Std.	HEINZ-Körperbildung	Nervöse Erscheinungen
Nitrobenzol[1]	0,86	6	++	(+)
Dinitrobenzol[1]	7,8	10	+++	—
Trinitrobenzol[1]	4,8	1	+++	—
Chlornitrobenzol	2,3	10	++	—
Dinitrochlorbenzol . . .	0,6	5	+	—
Nitroanilin	3	6	++	—
Phenylendiamin.	1,4	18	—	—
Anilin (HERKEN[8]). . . .	2,5	?	?	?

Aus ihr folgt:

a) Einführung eines Cl-Atoms in m-Stellung steigert die Giftigkeit des Nitrobenzols; dagegen setzt Cl in o- und p-Stellung die Giftigkeit des Dinitrobenzols erheblich herab. — Eine Cl-Substitution verhält sich qualitativ wie eine Nitrosubstitution.

b) Einführung einer Nitrogruppe in Anilin steigert die Giftigkeit, Einführung einer Aminogruppe setzt sie dagegen herab.

2. Schlußfolgerungen für das Verhalten des Dinitrobenzols in vivo.

Die größere Wirksamkeit des Dinitrobenzols gegenüber dem Mononitrobenzol versucht HERKEN[2] durch die Annahme einer sukzessiven oder gleichzeitigen Reaktion beider Nitrogruppen des Dinitrobenzols zu

deuten. Da eine Cl-Substitution ebenso wie eine Nitrosubstitution die Giftigkeit des Nitrobenzols steigert, und da an der Cl-Gruppe keine katalytische Umsetzung denkbar ist, erledigt sich diese Annahme. Auch ein Vergleich der Wirksamkeit des Nitroanilins und des Phenylendiamins mit der des Dinitrobenzols führt zu diesem Ergebnis. Nitroanilin verhält sich in all seinen Vergiftungserscheinungen wie das Dinitrobenzol und somit grundsätzlich anders als das Phenylendiamin. Es muß daher angenommen werden, daß das Nitroanilin als „Anilin" und nicht als „Nitrobenzol" reagiert, da nur in diesem Falle ein Übergang in das auch aus dem Dinitrobenzol entstehende Radikal möglich ist.

Für das Phenylendiamin wäre genau so wie für das Nitroanilin und das Dinitrobenzol ein Übergang in ein Diphenylhydroxylamin denkbar. Es müßte somit, entsprechend den Verhältnissen bei den Nitroverbindungen, erheblich stärker Hämiglobin bilden als Anilin. Dies trifft ebenfalls nicht zu.

Die erhöhte Wirksamkeit des Dinitrobenzols beruht somit nicht auf einer chemischen Reaktion an der zweiten Gruppe, sondern auf einer Beeinflussung der Reaktionsmöglichkeiten (Tempo der Phenylhydroxylaminbildung, katalytische Wirksamkeit des Radikals usw.) der ersten Nitrogruppe.

Zusammenfassung.

Einführung von Cl in m-Stellung steigert die Giftigkeit von Nitrobenzol, Cl in o- und p Stellung setzt dagegen die des Dinitrobenzols erheblich herab. Nitroanilin ist als Hämiglobinbildner mehr, Phenylendiamin dagegen bedeutend weniger wirksam als Anilin.

Literatur.

[1] Bredow, M. v. u. F. Jung: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **200**, 335 (1942). — [2] Herken, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **202**, 70 (1943). — [3] Dubachinskaja u. Levine: Nach Ronas Ber. **104**, 503 (1938). — [4] Wells, H. G.: J. industr. Hyg. (Am.) **2**, 247 (1920/21). — [5] Landsteiner, K. u. M. W. Chase: J. exper. Med. **66**, 337 (1937). — [6] Meissner, R.: Biochem. Z. **93**, 149 (1918). — [7] Stadelmann, E.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **23**, 427 (1887). — [8] Herken, H.: Unveröff.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin und dem Laboratorium für Übermikroskopie der Siemens & Halske AG., Berlin-Spandau.

Zur Pathologie der roten Blutkörperchen.

II. Mitteilung *.

Wirkungen einiger Metallsalze.

Von

Fritz Jung.

Mit 19 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. Juli 1944.)

1. Fragestellung.

In der vorhergehenden Mitteilung[1] wurde über morphologische und funktionelle Veränderungen an Erythrozyten berichtet, die sich als Folge einfacher physikalischer Schädigungen, wie Hitze und Kälte, Strahlung und Ultraschall einstellen. Das Ziel der gesamten Untersuchung ist die Deutung der mannigfaltigen, an Erythrozyten zu beobachtenden, pathologischen Erscheinungen, die sich in vivo bei verschiedenen Vergiftungen zeigen. Dazu werden zunächst in vitro gut definierte Einwirkungen gesetzt: Im folgenden wird die Wirkung einiger Metallsalze behandelt. Die verwandten Salze besitzen noch spezielles pharmakologisches Interesse, doch kann in dem abgegrenzten Rahmen nicht jede auftauchende Teilfrage besprochen werden. Die Verwendung des Übermikroskops hat sich für unser Vorhaben, wie in verwandten Gebieten, äußerst fruchtbar erwiesen (vgl. auch die Arbeiten von H. Ruska und C. Wolpers [2]).

Metallsalze können an Geweben und Organen die verschiedensten Erscheinungen herbeiführen: klinisch Adstriktion und Ätzung, histologisch Fixierung, physikalisch Koagulation. Die bisher üblichen Beobachtungsmethoden ergaben allerdings an den unserer Untersuchung zugrunde liegenden roten Blutzellen eine eintönige Reaktionsweise: Es war entweder Hämolyse oder Fixation beobachtet worden (Meneghetti[3]). Feinere Veränderungen der Zelloberfläche lassen sich mit Hilfe der Senkungsreaktion, der Agglutination, kataphoretischer Messungen und verwandter Methoden feststellen, ohne daß ein anschauliches Bild der vorliegenden Verhältnisse erhalten wird. Die lichtoptische Untersuchung ergibt nur wenig, die Zelle ist meist deformiert, manchmal mit feinsten Körnchen besetzt. Neben den Stromaten findet sich unter Umständen koaguliertes Hämoglobin im Präparat. An Hand dieser Erscheinungen ist es möglich, die Metallsalze zu

* I. Mitteilung: F. Jung, Klin. Wschr. **1942**, 917.

klassifizieren (Hooker [4]). Man wird ihre Wirkungen auf die Fähigkeit zurückführen, mit Eiweißkörpern oder Lipoiden der Zellmembran sowie mit den Zellinhaltsstoffen Verbindungen einzugehen.

Für die vorliegende Untersuchung wurde das *Sublimat* als Beispiel eines ätzenden, das *Zinksulfat* und das *Bleinitrat* als Beispiel eines adstringierenden Stoffes gewählt.

Die wesentlichsten Untersuchungsmethoden sind bereits in der I. Mitteilung geschildert worden. Die übermikroskopischen Untersuchungen erfolgten mit dem Übermikroskop nach E. Ruska und B. v. Borries [5]. Messungen der Wasserstoffionenkonzentration wurden mit einem Potentiometer der Firma Siemens mittels der Chinhydronelektrode vorgenommen. Sämtliche Versuche betreffen menschliche Blutkörperchen. (Bei Tieren werden in Einzelfällen etwas andere Ergebnisse erhalten.) Die Resistenzreihen wurden in Verdünnungen einer Tyrodelösung angesetzt, bei den Versuchen mit Zink- und Bleisalzen jedoch meist in physiologischer Kochsalzlösung, um ein Ausfallen des Zink- oder Bleiphosphats zu vermeiden.

2. Versuche mit Sublimat.

Über die Einwirkung von Sublimat auf rote Blutkörperchen liegen Befunde von Detre und Sellei [6], ferner von Bechhold und Kraus [7] vor: Hohe Sublimatkonzentrationen festigen die Zelle und färben sie braun, geringe führen zu Hämolyse. Da die Dichte der verwandten Zellsuspensionen nicht angegeben wird, lassen sich die Konzentrationsangaben dieser Autoren nur ungefähr verwerten. Bechhold und Kraus beobachteten ferner, daß im Dunkelfeld während der Sublimathämolyse eigentümliche schlauchartige und blasenförmige Gebilde von der Zelloberfläche ausgehen. Wahrscheinlich handelt es sich um ein beim Zusammentreffen des austretenden Hämoglobins mit der eiweißfällenden Sublimatlösung auftretendes Phänomen, etwa ähnlich den Erscheinungen, die beim Zusammentreffen einer sauren Metallsalzlösung mit einer alkalischen Silikatlösung beobachtet werden. Meneghetti [3] fand bei systematischen Untersuchungen mit steigender Sublimatkonzentration erst Hämolyse, dann reversible Koagulation (d. h. die Zellen verlieren ihr Hämoglobin noch nach Auswaschen des Sublimats), schließlich irreversible Koagulation oder Fixierung. Beginnende Hämolyse sah er bei $5 \cdot 10^{-17}$ Äquivalenten Sublimat/Zelle. Wilbrandt [8] stellte fest, daß 10^{-4} molares Sublimat vorübergehend die Glyzerinpermeabilität der Zelle herabsetzt. Doch soll dieser Effekt nur solange vorhanden sein, als Hg durch die Membran wandert. Beseitigung des Hg als komplexes Zyanid läßt ihn verschwinden. Auch Lepeschkin [9] weist wie Meneghetti darauf hin, daß Sublimat die Zellen unter Umständen in der Weise schädigt, daß nach Entfernung des Sublimats noch nach vielen Stunden Hämolyse eintritt. Die Überlegungen und Befunde Wilbrandts machen diesen Effekt verständlich: Sublimat in geringen Mengen macht die Zellen kationenpermeabel, womit diese notwendig auch in isotonem Medium der kolloidosmotischen Hämolyse verfallen.

a) Einwirkung von Sublimat auf isolierte Erythrozytenmembranen.

Die Zellen wurden mit dest. Wasser hämolysiert, die Stromaten hämoglobinfrei gewaschen und dann in Tyrodelösung aufgeschwemmt, der wechselnde Mengen Sublimat (bis zu 1%) zugesetzt waren. Dort verblieben sie bei Zimmertemperatur oder bei 40°. Die Einwirkungsdauer war ohne merkbaren Einfluß auf die auftretenden Veränderungen. Nach Auswaschen des Sublimats und der Tyrodelösung mit destilliertem Wasser wurden die Membranen sofort oder nach zusätzlicher Fixation mit Osmiumsäure betrachtet. Unter der Behandlung ging das feine glasig gelbliche Aussehen einer Suspension unbehandelter Erythrozytenmembranen verloren, statt dessen wurde ein weißer grobflockiger Niederschlag erhalten, der sich allerdings beim Schütteln wieder fein verteilte. Er bestand nur aus Stromaten, die lichtoptisch zum Teil deformiert erschienen.

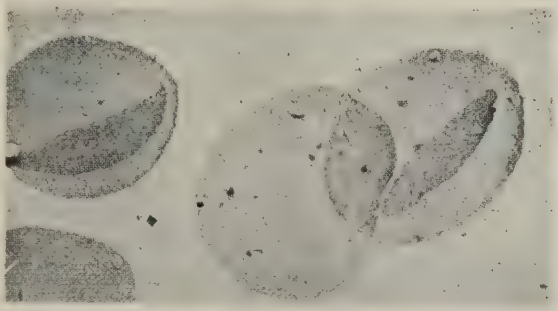


Abb. 1. 4960/42. Normale menschliche Erythrozytenstromata unfixiert. El.-opt.: 4000 : 1.

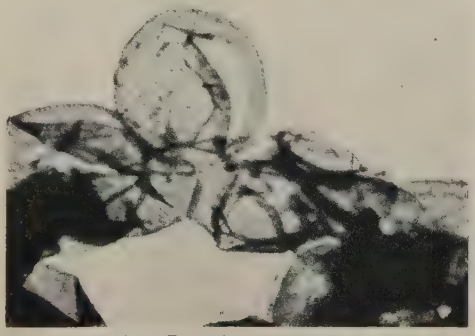


Abb. 2. 4958/42. Dasselbe nach Einwirkung einer 1%igen Sublimatlösung. El.-opt.: 4000 : 1.

Die normale Erythrozytenmembran ist nach C. Wolpers[2] im unfixierten Zustand ein sehr dünnes und zartes Gebilde, an dem kaum eine Struktur zu bemerken ist; erst nach Behandlung mit Lipoidlösungsmitteln und Osmiumsäure tritt ein feines Netz von Eiweißmizellen hervor (Wolpers). Gegen Deformation ist es ziemlich nachgiebig; obwohl es ein Raumgebilde darstellt, legt es sich bei der Auftrocknung meist ohne Faltenbildung auf den Objektträgerfilm (Abb. 1). *Hohe* Sublimatkonzentrationen (0,5 oder 1%), die über mehrere Stunden einwirken, führten zu einer erheblichen Dichtezunahme der Membran (Abb. 2). Ferner zeigte sie dann, ebenso wie die osmierte Membran, ausgesprochen scharf geschnittene Falten. Es müssen sich also die mechanischen Eigenschaften, speziell die Dehnbarkeit, verändert haben, ohne daß die Feinstruktur erheblich gelitten hätte. Da man auch bei stärkerer Vergrößerung keine stark absorbierenden Partikel

erkennen kann, die Membranen aber erheblich dichter geworden sind, muß sich das Hg diffus in sehr feiner Verteilung in die Membran eingelagert haben. *Geringere* Sublimatkonzentrationen (0,01%) ergaben ein anderes Bild (Abb. 3). Die Zellen waren sehr verletzlich geworden, so daß eine Nachfixation mit Osmiumsäure (nach Auswaschen des Sublimats) notwendig wurde. Bei schwacher elektronenoptischer Vergrößerung fiel wiederum die Dichteänderung als Zeichen der Sublimataufnahme auf. Bei stärkerer Vergrößerung wurde zusätzlich eine weitgehende Zerstörung der Feinstrukturen erkennbar. Während die normale osmiumfixierte Membran ein homogenes Gebilde darstellt, zeigte sich nun ein Netzwerk mit größeren und kleineren Löchern (Abb. 3). Besonders deutlich war dies an den Umschlagstellen der Membran. Eine Fixierung im Sinne der Histologen kann man diese Einwirkung nicht mehr nennen, denn das Eiweiß der Membran ist so koaguliert worden, daß das ursprüngliche Gefüge der Eiweißmizellen verlorenging. Mit wenig Sublimat behandelte Membranen waren ferner gegen Schütteln viel empfindlicher als unbehandelte. (AUB, REZNIKOFF und SMITH[10] haben dasselbe für Pb-Salze festgestellt; auch bei Tannin ist ein derartiger Effekt vorhanden, BOHLMANN[14].)

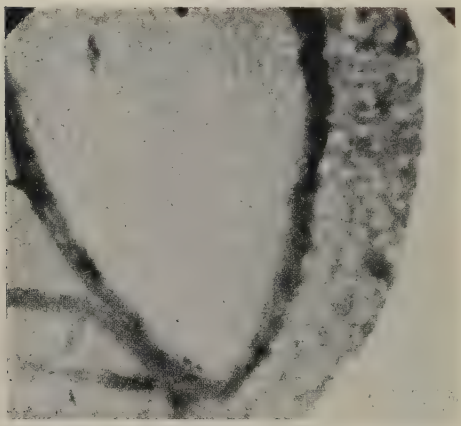


Abb. 3. 3491/42. Erythrozytenstroma mit 0,01% Sublimat behandelt, mit Osmiumsäure nachfixiert. El.-opt.: 15000 : 1.

b) Einwirkung fixierender Sublimatkonzentrationen auf Erythrozyten.

Durch *sehr hohe* Sublimatkonzentrationen wird die Zelle augenblicklich und durchgehend fixiert. Das elektronenoptische Bild zeigt dann keine Besonderheiten gegenüber osmiumfixierten Zellen, denn das elektronenoptisch dichte Hämoglobin verdeckt feinere Struktureigentümlichkeiten.

Geringere Sublimatkonzentrationen führen dagegen zu einem sehr eigentümlichen Phänomen, das allerdings nicht in gleicher Weise bei Blutzellen aller Tiere auftritt. Menschliche Erythrozyten wurden in isotonischer Tyrode mit 0,05% Sublimat mehrere Stunden aufgeschwemmt. Beim Einbringen in destilliertem Wasser hämolysierten sie dann nicht mehr. Lichtoptisch hatte danach jede Zelle, die übrigens ihre Napf- oder Glockenform völlig beibehalten hatte, einen feinen Hof (Abb. 4). Beim Erschüttern des Präparats zeigte sich, daß es sich um eine feine Membran handelt, die sich allseitig von der Zelle losgelöst hat. Damit ist ein weiterer Hinweis auf die

Existenz einer echten Erythrozytenmembran gegeben, d. h. einer Außenschicht, die ihrem Wesen nach vom Zellinhalt verschieden ist.

Die elektronenoptische Darstellung zeigt innerhalb der Zelle die dichte Masse des sublimatfixierten Hämoglobins (Abb. 5). Auch die zentrale Aufhellung, die der Eindellung der unbehandelten roten Blutzelle entspricht (allerdings durch Retraktion des koagulierten Farbstoffs noch deutlicher wird), tritt gut hervor: Das Hämoglobin ist innerhalb der Hülle in „Ringform" denaturiert. Um diesen Ring von denaturiertem Eiweiß legt sich die Membran, welche nach Osmiumfixation eine sehr ausgeprägte Faltenbildung besitzt (Abb. 6). (Wird nicht nachfixiert, so macht sie einen ziemlich homogenen Eindruck und erinnert etwas an die Membranen von Abb. 2 und 3.)

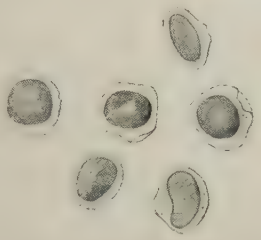


Abb. 4. Lichtoptisches Bild von Erythrozyten nach Behandlung mit 0,05% Sublimat.

Bei noch geringeren Sublimatkonzentrationen muß nachfixiert werden, da sonst die Zellen bei der Herstellung des übermikroskopischen Präparats zugrunde gehen. Wie sich vor allem aus Abb. 7 ergibt, besteht die Membran dann aus einer ziemlich dichten Masse von Eiweißkoagula, in

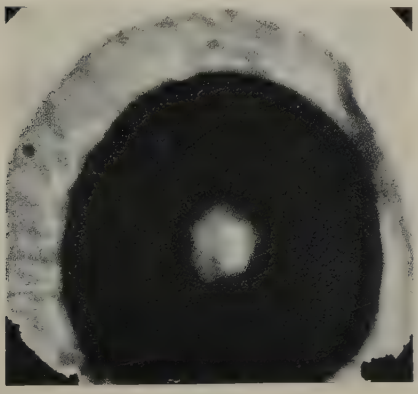


Abb. 5.

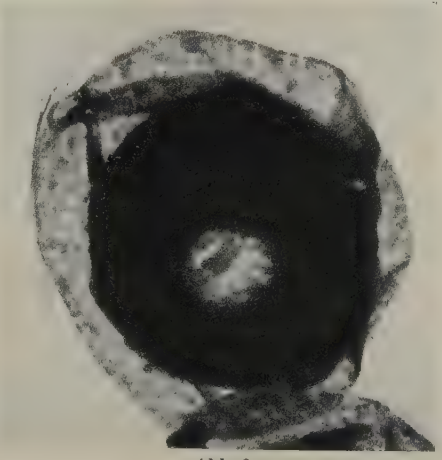


Abb. 6.

Abb. 5. 2972/42. Menschlicher Erythrozyt nach Behandlung mit 0,05%iger Sublimatlösung und anschließender Übertragung in destilliertem Wasser. El.-opt.: 12000 : 1.

Abb. 6. 3001/42; el.-opt.: 12000 : 1. Wie Abb. 5, jedoch 0,02% Sublimat und anschließende Osmiumfixation.

welcher sich zahlreiche Löcher von 0,05 bis 0,2 μ Durchmesser befinden. Daß es sich wenigstens zum Teil um echte Löcher handelt und nicht um optisch dünnere Stellen, läßt sich am Umschlagsrand der Membran nachweisen. Das klumpige und schwammige Aussehen erinnert sehr an koaguliertes Hämoglobin.

Die angewandten Sublimatkonzentrationen härten also die Zellen nicht so intensiv und schnell, daß das koagulierende Eiweiß seine ursprüngliche „übermikroskopische" Struktur behalten würde. Es kommt zu Schrumpfungs- und Verklumpungsprozessen, wobei sich verschiedenartig zusammengesetzte Teile der Zelle voneinander lösen können. Ein zentrales Koagulat wird vom Hämoglobin gebildet; die Außenschicht, welche weniger aus Hämoglobin denn aus Stromatin besteht, schrumpft weniger und hebt sich infolgedessen ab. Wie jedoch ihre unregelmäßige Oberfläche, die

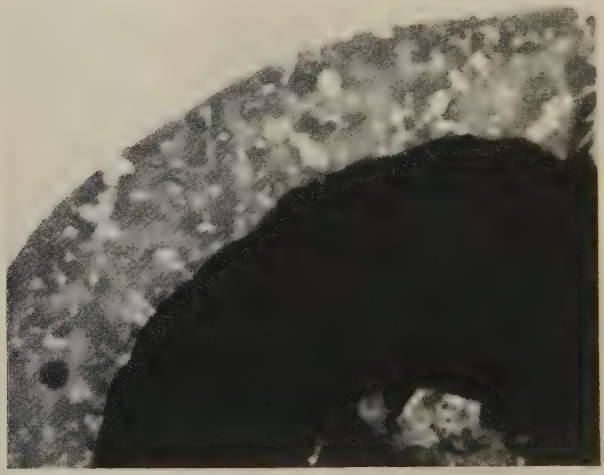


Abb. 7. 3004/42; el. opt.: 16000 : 1 (lichtopt. nachvergr.).

Löcher wie die Brüchigkeit zeigen, ist sie dabei selbst auch unvollständig fixiert. Genau dieselben Membranveränderungen waren unter anderem an der hämoglobinfreien Zelle aufgetreten. Nur ist nunmehr die Membran durch anhaftendes und koaguliertes Hämoglobin wesentlich dichter und durch das Schrumpfen dieses Hämoglobins zusätzlich deformiert und zerstört (vgl. auch weiter unten).

c) Die Sublimathämolyse.

Für die beginnende Hämolyse gibt MENEGHETTI[3] an, daß $5 \cdot 10^{-17}$ Äquivalente Sublimat je Zelle vorhanden sein müssen. Das wären $1{,}5 \cdot 10^{7}$ Moleküle je Zelloberfläche, eine außerordentlich kleine Zahl im Verhältnis zu der Ladung an der Erythrozytenoberfläche[11]. Aus methodischen Gründen sind aber MENEGHETTIS[3] Werte zu niedrig. Das Sublimat wird nämlich sehr schnell und sehr fest an die Zellen gebunden. Wird eine Erythrozytensuspension mit Sublimat geschüttelt und dann wieder abzentrifugiert, so ist im Überstehenden kein Sublimat mehr nachzuweisen. Erfolgt beim Zusammenbringen der Zellen mit dem Sublimat die Durchmischung nicht sehr schnell und gleichmäßig, so haben einzelne Zellen

die Möglichkeit, mehr Sublimat aufzunehmen als die anderen. Damit tritt in Sublimatlösungen bereits dann partielle Hämolyse auf, wenn die Sublimatmenge pro Zelle noch weit unter der hämolytischen Grenze liegt. Bei quantitativen Messungen kann dieser Effekt sehr störend sein und ich finde bei MENEGHETTI keine Angaben darüber, wie er ihn vermieden hat.

Zur Bestimmung der eben hämolytisch wirkenden Sublimatmenge wurden Zellsuspensionen steigender Dichte hergestellt und zu jeder jeweils dieselbe Sublimatmenge gegeben; dabei war das Sublimat von vornherein in einem viel größeren Flüssigkeitsvolumen gelöst. Außerdem wurde es

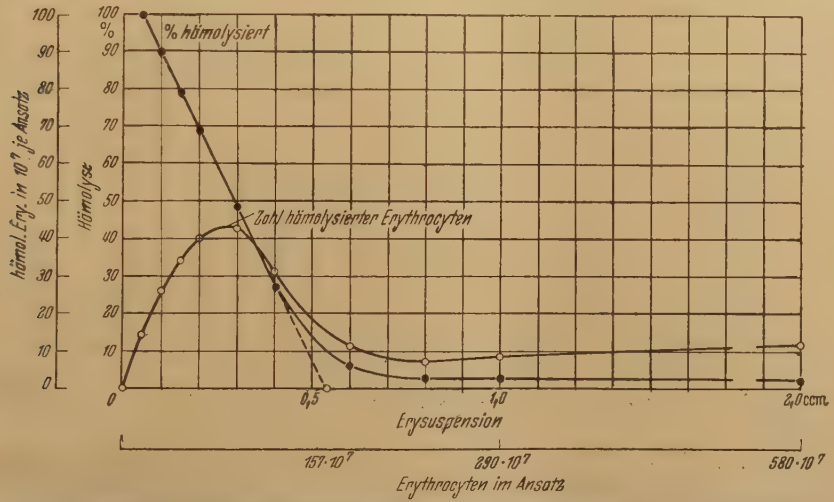


Abb. 8. Abszisse: ccm Erythrozytensuspension bzw. Erythrozyten insgesamt. Ordinate: % Hämolyse und hämolysierte Erythrozyten in 10^7 Zellen je Ansatz. Sublimat 0,1 mg pro Ansatz. Lösungsvolumen 10 ccm. Einwirkungsdauer 7 Stunden. Temperatur 40°.

unter gleichzeitigem heftigem Schütteln über den Erythrozytenbrei gegossen. Dann kamen die Suspensionen für 6—7 Stunden in den Thermostaten bei 40°. Zur Feststellung des Hämolysegrades wurden die Zellen zu Versuchsende abzentrifugiert und das überstehende Hämoglobin kolorimetrisch bestimmt. In Abb. 8 ist ein derartiger Versuch wiedergegeben. Bei geringer Erythrocytenzahl war die Hämolyse vollständig, mit zunehmender Zellzahl nahm zunächst die absolute Menge hämolysierter Zellen zu, der prozentuale Anteil nahm dagegen stetig ab. Schließlich verminderte sich auch die Gesamthämolyse, doch wurde sie nie Null (Durchmischungseffekt). Durch graphische Extrapolation läßt sich die Zellenzahl ermitteln, bei der die Hämolyse eben verschwinden würde. Einzelheiten hierzu lassen sich aus Abb. 8 entnehmen.

Der Grenzwert der Hämolyse wurde bei $2{,}4 \cdot 10^{-16}$ Mol $HgCl_2$ je Zelle erreicht. Das waren $1{,}4 \cdot 10^8$ Moleküle, also etwa 10mal so viel als MENEGHETTI fand. Vollständig war die Hämolyse etwa bei der zehnfachen

Sublimatmenge je Zelle. Eine geringe weitere Steigerung des Sublimatanteils führte bereits zu Trübung durch Hämoglobinausfällungen. In einem zweiten Versuch wurden als Grenzwert 1,2—1,4·10^8 Moleküle erhalten.

Diese Werte sind größenordnungsmäßig ganz interessant, da BUNGENBERG DE JONG[11] auf Grund ganz andersartiger Versuche 2,0—2,9 · 10^8 negative Ladungen auf der Erythrozytenoberfläche annimmt, die von einer monomolekularen Schicht von Phospholipoiden herrühren sollen.

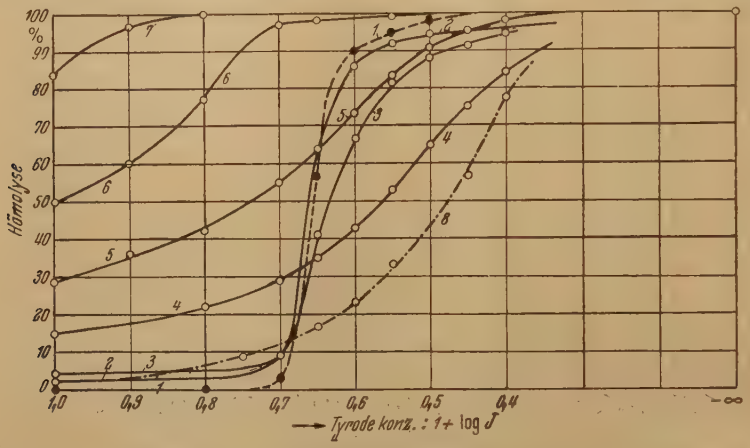


Abb. 9. Abszisse: Konzentration der Tyrodelösung, angegeben als log der Verdünnung einer isotonischen Lösung (1 + log J). Ordinate: % Hämolyse.

1. Ohne Sublimat
2. 2,5 · 10^{-4} % Sublimat
3. 5 · 10^{-4} % „
4. 1 · 10^{-3} % „ (~ 5,0 · 10^{-18} Äquiv./Zelle)
5. 2,5 · 10^{-3} % „
6. 5 · 10^{-3} % „
7. 1 · 10^{-2} % „
[8. 2 · 10^{-3} % „ besonders angesetzter Versuch, vgl. hierzu Text]

Lösungsvolumen: 2 ccm
Einwirkungsdauer: 6 Stunden
Temperatur: 40°

im Ansatz sind jeweils 1,45 · 10^6 Zellen/ccm

Obwohl sich, nach den Beobachtungen von WOLPERS, manches gegen diese Ansicht einwenden läßt, verblüfft doch die gute Übereinstimmung. Man könnte sich z. B. vorstellen, daß das Hg, solange noch Reaktionen an diesen Phospholipoiden möglich sind, nicht an Stellen (Eiweiß) gebunden wird, die für den Permeabilitätszustand der Membran wesentlich sind.

Um die Abhängigkeit der osmotischen Resistenz von einer Behandlung mit verschiedenen Sublimatkonzentrationen festzulegen, wurden Erythrozytensuspensionen 4—6 Stunden bei 40° mit Sublimat zusammengebracht und dann Resistenzreihen angesetzt. Es ist wohl verständlich, daß dabei die Bedingung eines schnellen und ungestörten Vermischens nicht eingehalten werden konnte. Deshalb lag auch in diesen Versuchen die hämolytische Grenzkonzentration erheblich tiefer, etwa den Angaben von MENEGHETTI entsprechend. Der flache Verlauf der Kurven demonstriert unmittelbar die ungleichmäßige Beeinflussung der einzelnen Zellen des Versuchsansatzes (Abb. 9).

Sehr geringe Sublimatkonzentrationen führen zu einer nicht unbeträchtlichen *Steigerung* der osmotischen Resistenz. Zwar hämolysieren in destilliertem Wasser die Zellen immer noch spontan, aber Einzellösungen aus unserer Verdünnungsreihe, die normale Zellen zu 93% zerstören, bringen vorbehandelte Zellen nur zu 50% zum Zerfall (Kurve 4). Je sorgfältiger die Durchmischung vorgenommen wird, desto deutlicher tritt die Erscheinung hervor. Kurve 8 stellt einen Einzelversuch dar, in welchem besonders darauf geachtet wurde; dabei tritt auch die Hämolyse in den höheren Tyrodekonzentrationen entsprechend zurück. Es liegt nahe, eine oberflächliche Bindung des Sublimats an die Zelle für jene Resistenzsteigerung verantwortlich zu machen, insonderheit da wir wissen, daß bereits ziemlich viel Sublimat an die Zelle gebunden wird, bevor hämolytische Wirkungen auftreten. Bungenberg de Jong[11] sagt in seiner Arbeit dieses Verhalten der Schwermetalle voraus, ohne daß ihm selbst der Nachweis des Effektes bei Silbernitrat gelungen wäre: Die Zellmembran werde durch geringe Mengen Quecksilber verfestigt, durch größere dagegen in ihrer Struktur so verzerrt und verändert, daß Hämolyse eintrete. Man kann aber im Anschluß an die oben zitierten Versuche von Wilbrandt die Erscheinung auch als Folge einer Pemeabilitätsabnahme der Zellmembran auffassen.

Höhere Sublimatkonzentrationen führen verhältnismäßig schnell zur Hämolyse. Wenn auch die Kurven nicht die typische Form einer kolloidosmotischen Hämolyse zeigen, so könnte doch die Abweichung wenigstens zum Teil auf Durchmischungseffekte zurückgeführt werden. Es müssen aber tiefergreifende Vorgänge vorhanden sein, wie die übermikroskopischen Bilder eindeutig zeigen.

Die Stromata sublimathämolytischer Erythrozyten machen lichtoptisch einen etwas zerfalteten, zerknitterten Eindruck. An der Oberfläche erscheinen sie ringsum mit feinsten Körnchen besetzt. Im durchfallenden Licht sind im Präparat fast regelmäßig Eiweißkoagula zu finden, im Dunkelfeld beeindrucken die von Bechhold und Kraus beschriebenen Strukturen. Bei der Präparation für die elektronenoptische Darstellung gehen diese Verunreinigungen zum größten Teil verloren, die Eiweißgerinnsel, die sich im Präparat noch finden, zeigen Beziehungen zu denjenigen, die im lichtoptischen Hellfeld beobachtet werden, dagegen nicht zu den bizarren Gebilden des Dunkelfeldes.

Die Stromata aus dem Versuch von Kurve 7 wurden abzentrifugiert und mit destilliertem Wasser gewaschen. Sie werden dabei nicht hämoglobinfrei erhalten, sondern bleiben stets kräftig rotbraun. Außerdem sind sie sehr verletzlich geworden und neigen zur Verklumpung. Wie Abb. 10 und 11 ergibt, machte die Membran den Eindruck eines schwammartigen Eiweißgerinnsels, d. h. sie entsprach dem Bild, das für die abgehobenen Erythrozytenmembranen (vgl. oben Abb. 5—7) erhalten wurde.

Jenes war bei einer Sublimatkonzentration von 0,05—0,02% aufgetreten, bei der nun verwandten geringeren Sublimatmenge ist der Hämoglobinkern

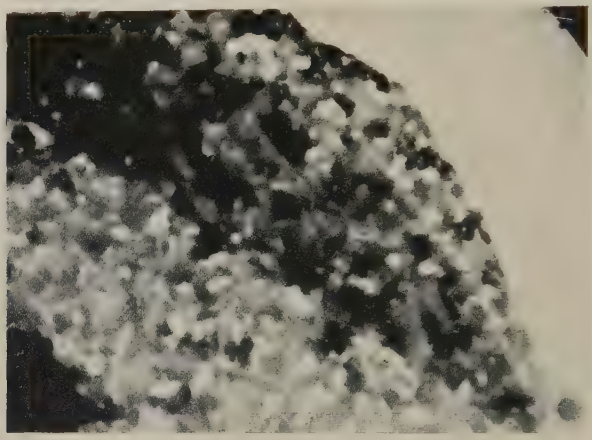


Abb. 10. 3289/42; el.-opt.: 18000 : 1. Menschlicher Erythrozyt nach Behandlung mit etwa 0,01% Sublimat und anschließender Übertragung in destilliertes Wasser.

nicht mehr durchfixiert worden und konnte in Lösung gehen. Der ungewöhnlich hohe Hämoglobingehalt des Stromaniederschlags zeigte, daß ein Teil des Zellinhalts mitdenaturiert wurde, vermutlich die Oberflächenschichten. Eigentümlich ist, daß wir hier ebensowenig wie oben Reste der ursprünglichen Erythrozytenmembran vorfinden. Wie aus Abschnitt 1 hervorgeht, bringt das Sublimat diese keineswegs zum Verschwinden. Hier hilft ein Zufallsbefund weiter (Abb. 12). Mehrere Zellen dieses Präparats besaßen auf der einen Seite noch die fast normale Membran, in der anderen Hälfte waren dagegen nur noch dicke Eiweißkoagula zu sehen. In den Lücken dieses Koagulums ist die Membran verschwunden. Man hat hier den Beleg, daß das koagulierende und deshalb auch schrumpfende Hämoglobin der obersten Zellschichten die anliegende feine Membran mitgerissen und dabei zerstört hat. (Wahrscheinlich hat in diesem Versuch

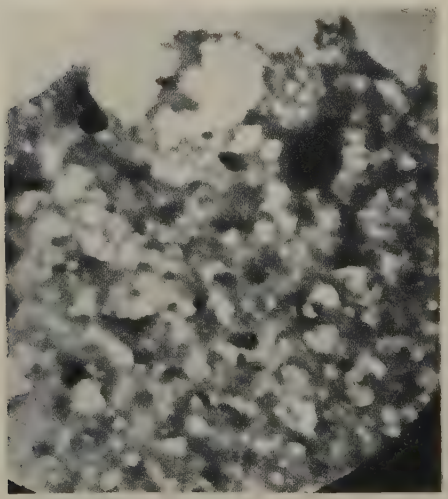


Abb. 11. 3286/42; el.-opt.: 16000 : 1. Menschlicher Erythrozyt nach Behandlung mit etwa 0,01% Sublimat und anschließender Übertragung in destilliertes Wasser.

das Sublimat nur einseitig auf die Zelle eingewirkt, wodurch die Membran auf der anderen Seite erhalten blieb.)

In weiteren Versuchen wurde nicht abgewartet, bis das Sublimat zur Hämolyse führte, sondern die scheinbar unveränderten Zellen wurden schnell abzentrifugiert und mit einem großen Überschuß von destilliertem Wasser hämolysiert. Auch hier waren die Stromaniederschläge wesentlich hämoglobinreicher als sonst. Abb. 13 gibt den übermikroskopischen Befund. Die Membran war der Form nach erhalten, allerdings ziemlich geschrumpft und gerissen. Da eine noch hämoglobinhaltige Zelle präpariert wurde, muß die zunächst intakte Membran im Verlauf der weiteren Präparation auf diese Weise zerstört worden sein. (Im Parallelversuch hämolysierten dieselben Zellen spontan innerhalb einer halben Stunde.) Eine ähnliche Schrumpfung und Löcherbildung war übrigens oben für isolierte Stromata auch beschrieben worden.

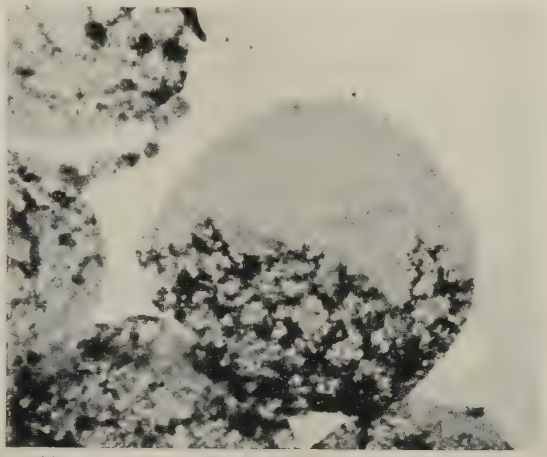


Abb. 12. 3140/42. Erythrozytenmembran mit partieller Einlagerung von Hämoglobinkoagulaten. El.-opt.: 8000:1.

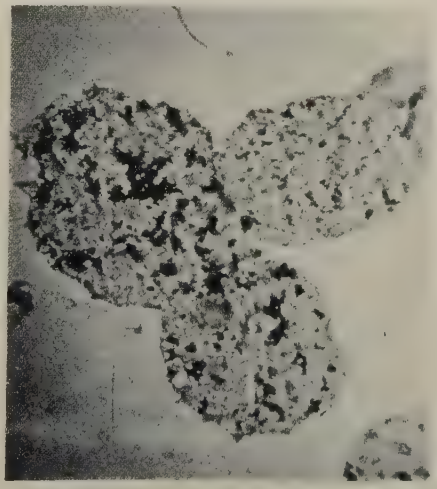
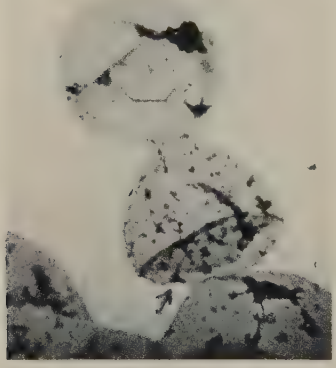


Abb. 13. 4983/42. Erythrozytenmembran nach kurzfristiger Sublimateinwirkung 0,01% und nachfolgender osmotischer Hämolyse. El.-opt.: 4000 : 1.

Die Sublimathämolyse ist somit keine reine kolloidosmotische Hämolyse, da eine solche eine unzerstörte Membran voraussetzt, die zwar ihre selektive Ionenpermeabilität verloren hat, jedoch noch größere Moleküle, wie etwa das Hämoglobin zurückzuhalten vermag. Nach WILBRANDT würde man den hämolytischen Prozeß als „nichtosmotische Hämolyse" bezeichnen müssen. Wahrscheinlich handelt es sich aber um einen Übergang zwischen beiden Formen, in dem am Verlauf *eines* Prozesses — der

fortschreitenden Eiweißdenaturierung — erst eine geringe Strukturvergröberung zur kolloidosmotischen Schwellung führt, dann tiefergreifende Membranzerstörungen das Hämoglobin durch die „Löcher" so entweichen lassen.

Neben der Membranveränderung kann man dichte unregelmäßig geformte Verschattungen innerhalb der Zelle sehen, zweifellos örtliche Ausfällungen von Hämoglobin. Es beginnt somit hier bereits jener Vorgang, der bei größeren Sublimatkonzentrationen die schwammartigen Eiweißkoagula unter der Membran verursacht.



Abbb. 14. 4987/42. Erythrozytenmembranen nach Behandlung mit kleinsten, nicht hämolytisch wirksamen Sublimatmengen (etwa 1×10^{-6} Mol $HgCl_2$/Zelle) und nachfolgender osmotischer Hämolyse. El.-opt.: 4000 : 1.

Werden Sublimatkonzentrationen verwandt, die nicht mehr direkt hämolytisch wirken, sondern zunächst Resistenzsteigerungen herbeiführen, so zeigen die Membranen *keine* Veränderungen. Vgl. hierzu Abb. 1 und 14. Dafür sind aber innerhalb der Zelle *lokale* Ausfällungen des Hämoglobins aufgetreten. Nun ist uns das Bild einer *diffusen* Hämoglobinausfällung innerhalb der Zelle bekannt. (WOLPERS hat es als partielle Hämolyse beschrieben; bei der Kaliumchloratvergiftung der Katze habe ich es ebenfalls beobachten können.) Hier hat zweifellos ein ganz anderer Vorgang stattgefunden. Es ist nicht zu erklären, warum das Hb von dem Hg-Salz nicht gleichmäßig über die ganze Zelle hinweg ausgefüllt wird, wenn man nicht die unwahrscheinliche Annahme lokaler Membrandefekte, durch welche dann das Hg bevorzugt eindringt, machen will. Ebenso muß offen bleiben, ob die vermehrte Resistenz mit diesen Phänomen in irgend einem Zusammenhang steht.

Bei Versuchen zur Wärmehämolyse waren als Folge stärkerer Temperatureinwirkungen ähnliche Veränderungen beschrieben worden, wie wir sie nun hier bei der Sublimathämolyse kennengelernt haben (vgl. Abb. 10, 11, 12 mit Abb. 9 und 10 der I. Mitteilung). Auch die damals erwähnte „feine Grundmembran" ist wieder in Erscheinung getreten; es ist die eigentliche Erythrozytenmembran, die bei schwachen Einwirkungen noch erhalten bleibt, bei stärkeren Denaturierungsvorgängen der unterliegenden Schichten miterfaßt und zerrissen wird. Zerfallsgebilde, wie sie Abb. 10 und 11 zeigen, und wie sie in Abb. 10 der I. Mitteilung beschrieben worden sind, werden aber auch in vivo erhalten.

In seiner Arbeit über die elektronenoptische Darstellung des Malariaparasiten findet Wolpers[12] ein ganz entsprechendes Bild einer zerstörten Zelle. Er deutet es allerdings als Eiweißskelet einer Erythrozytenmembran; als Endstadium eines Koagulations- und Hämolyseprozesses an der Erythrozytenzelle ist es verständlicher. Ganz ähnliche Bilder sind auch als Endstadien der Blutkörperchenzerstörung bei Vergiftungen mit Phenylendiamin und Phenylhydrazin zu beobachten (Jung unveröffentlicht). Bei Vitalfärbung sehen alle diese absterbenden Zellen Retikulozyten sehr ähnlich.

Die lokalen Ausfällungen im Zellinnern würde man bei Beobachtung „in vivo" ohne weiteres als Innenkörperchen ansprechen. Es sind Ausfällungen von Hämoglobin im Zellinnern, die auch im Zusammenhang mit der Zellmembran stehen können (vgl. Abb. 14 mittlere Zelle, unterer Rand; Pfeil!). Heinz-Körper in derartig verzweigten Formen konnten allerdings beim Menschen niemals beobachtet werden, doch waren bei der Ratte nach Dinitrobenzolvergiftung ähnliche Gebilde aufzufinden (unveröffentlichte Versuche). Obwohl die echten Heinz-Körperchen im allgemeinen wenig oder fast kein Hämoglobin enthalten, während es sich hier um eindeutige Farbstoffausfällungen handelt, halte ich eine nahe Verwandtschaft für gegeben.

In welcher Form sich das Sublimat an die Zelle bindet, ist unklar. Bei Bakterien hat H. Ruska[2] gefunden, daß sich unter der Membran eigentümliche runde Kugeln von großer optischer Dichte bilden. Durch starke Elektronenbestrahlung gelangen diese Gebilde zur Verdampfung. Ich habe bei meinen sämtlichen Präparaten vergeblich versucht, Niederschläge oder Ausfällungen abzusublimieren; es ist nie gelungen, so daß man annehmen darf, daß in ihnen weder Sublimat noch sonst ein Quecksilbersalz, noch etwa Hg in freier Form vorhanden war.

3. Versuche mit Zinksalzen.

Im Gegensatz zu dem nicht (kaum) dissoziierten und daher auch nicht hydrolysierenden Sublimat hydrolysieren Zinksalze bereits bei neutraler Reaktion. Außerdem fällt Zn beim Zusammenbringen mit Tyrodelösung als Phosphat aus. Aus diesem Grunde wurden die Resistenzbestimmungen usw. in physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt. Damit muß man aber eine erhebliche Verschiebung des p_H in Kauf nehmen, die sicherlich nicht ohne Einfluß auf das Verhalten der Erythrozyten ist.

Spontane Hämolyse tritt in isotonischen Zinksulfatlösungen nicht auf, ebensowenig in Mischungen von Zinksulfat- und Kochsalzlösungen. Werden Resistenzreihen angesetzt, so läßt sich stets eine deutliche Verminderung der Resistenz beobachten; die Hämolysekurven sind parallel der Ausgangskurve verschoben, so daß es sich um einen reinen osmotischen Effekt (kolloidosmotische Hämolyse) handeln muß. Eine Steigerung der

Resistenz, die als Folge einer Adstriktionswirkung erwartet wurde, war nicht zu beobachten. Jedoch geht die Auswaschbarkeit des Hämoglobins aus den Zellen nach vielstündigem Aufenthalt in einer isotonischen Zinksulfatlösung erheblich zurück. Um die hellroten Zellen einigermaßen hämoglobinfrei zu bekommen, muß man sehr lange und wiederholt mit destilliertem Wasser waschen. Elektronenoptisch zeigen die Zn-behandelten Stromata keine auffallenden Veränderungen. Sie sind kaum merklich dichter geworden, allerdings bilden sie in unfixiertem Zustand ausgesprochene Falten und erscheinen daher nicht mehr so weich und nachgiebig wie normale Membranen (Adstriktionseffekt ?). Wurde nicht sehr lange gewaschen, so bleibt ein Rest Hämoglobin in der Zelle zurück, der dem Präparat eine etwas flockig wolkige Struktur gibt. Abb. 15 zeigt eine mit $ZnSO_4$ behandelte isolierte Membran mit ausgesprochener Faltenbildung, Abb. 16 einen längere Zeit in $ZnSO_4$ aufgeschwemmten Erythrozyten, der anschließend hämoglobinfrei gewaschen wurde.

Abb. 15. 6298/42. Mit $ZnSO_4$ behandelte Erythrozytenmembran. El.-opt.: 12000 : 1.

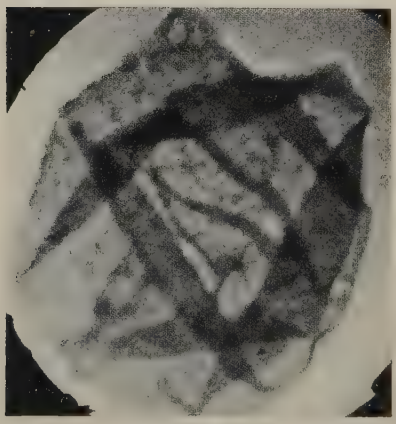


Abb. 16. 6310/42. Mit $ZnSO_4$ behandelter, dann hämolysierter Erythrozyt. El.-opt.: 11000 : 1.

4. Versuche mit Bleisalzen.

Die Wirkung von Bleisalzen auf Erythrozyten ist von AUB und Mitarbeitern[10] eingehend untersucht worden. Durch eine Bleikonzentration von 0,01 mg/ccm wird eine deutliche Resistenzsteigerung herbeigeführt. Größere Konzentrationen führen unter Umständen zu langsamer Hämolyse, doch ist auch dabei anfänglich die Resistenz vermehrt. Verminderte Agglutinationsfähigkeit, Herabsetzung des Haftvermögens an Glasflächen, schließlich eine sehr beschränkte Wasserpermeabilität zeichnen die behandelten Zellen aus und sie quellen und schrumpfen erheblich schlechter.

Ihre Oberfläche ist steif und unnachgiebig, denn die mechanische Empfindlichkeit ist sehr viel größer geworden. Vermutlich wird das Blei als anorganisches Phosphat in die Membran eingelagert. Während dieses Vorgangs kann es zu lokalen Verschiebungen des p_H kommen, die an den Veränderungen der Eigenschaften der Membran beteiligt sein können. Meine eigenen Versuche geben eine Ergänzung zu dem schon ziemlich klaren Bild.

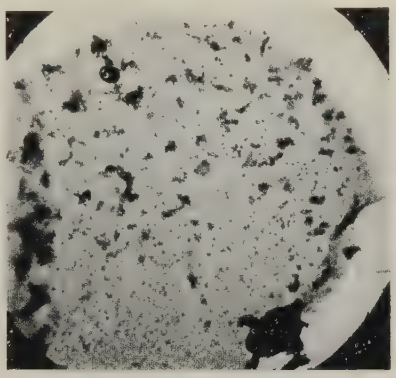


Abb. 17. 6293/42. Erythrozytenmembran mit Bleihydroxydniederschlägen. El.-opt.: 8000 : 1.

Auch Blei fällt in neutralen Lösungen als Hydroxyd, in Tyrodelösungen als Phosphat aus. Dabei ließ sich eine Erscheinung nachweisen, die für die essigsaure Tonerde bereits beschrieben worden ist. Wird eine saure Bleisalzlösung mit Kalilauge neutralisiert, so erhält man vorübergehend eine neutrale Reaktion, dann aber wird die Lösung wieder langsam sauer, da durch die Ausfällung des Bleihydroxyds nämlich OH-Ionen aus der Lösung verschwinden. Diese Bleihydroxyd- oder Bleiphosphatniederschläge (Abb. 17 und 18) werden sehr stark an die Erythrozytenoberfläche adsorbiert (die große Massendichte des Bleies erleichtert die Beobachtung sehr). Eigentümlicherweise adsorbieren die einzelnen Zellen einer Aufschwemmung verschieden stark: einige Zellen tragen nur vereinzelte Körnchen an der Oberfläche, andere wieder sind unter dem absorbierten Kolloid kaum mehr zu sehen. Die Art der Verteilung des Niederschlags an der Zelloberfläche, Aussehen und Größe der Partikelchen ändern sich von Versuch zu Versuch ganz beträchtlich. Soweit die Membranen nicht von solchen Niederschlägen bedeckt werden, erscheinen sie völlig normal und unverändert. Von gewöhnlichen fixierten Membranen sind sie nicht zu unterscheiden.

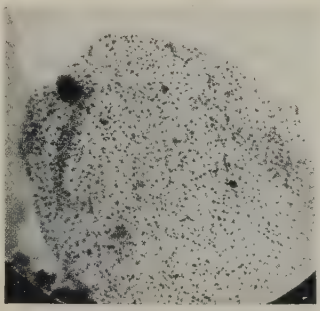


Abb. 18. 6295/42. Erythrozytenmembran mit Bleiphosphatniederschlägen. El.-opt.: 8000 : 1.

Wird nun dafür gesorgt, daß die Ausfällung des Bleies in der Erythrozytensuspension nicht zustande kommen kann, indem man die Zellen einfach in physiologischer Kochsalzlösung *ohne Pufferung* mit dem sauren Bleisalz zusammenbringt, so ergibt sich ein anderes Bild (Abb. 19). Die Membran wird erheblich dichter und erhält eine eigentümliche feinkörnige

Struktur. Offenbar ist Blei eingelagert worden, wie es auch die Versuche von AUB erwarten ließen. Dieser hatte nämlich festgestellt, daß bleibehandelte Zellen ein erheblich größeres spezifisches Gewicht besitzen. Bei Betrachtung einer stark vergrößerten Aufnahme läßt sich eben ein Niederschlag von allerfeinsten Körnchen in der Membran erkennen. (In der Reproduktion sind diese feinsten Körnchen nicht zu erkennen, da ihre Größe fast dem Rasterkorn entspricht.) Eigentümlich ist auch die feine Felderung der Membran, die nun deutlich hervortritt und die man vielleicht

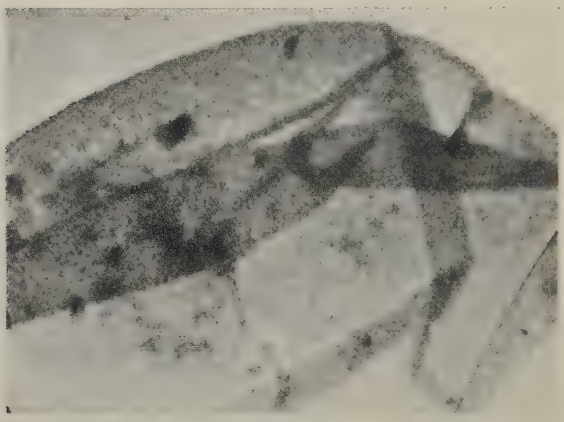


Abb. 19. 6312/42. Erythrozytenmembran mit saurem Bleisalz behandelt. El.-opt.: 18000 : 1.

den Vorstellungen WOLPERS' folgend durch eine Mehraufnahme von Blei an stark lipoidhaltigen Stellen erklären könnte. Das Blei fällt dabei innerhalb der Zellgrenzfläche aus. Die „Membran" ist, wie Analysen ergaben, phosphathaltig, so daß es sich um einen feinen Bleiphosphatniederschlag handeln könnte. Wahrscheinlicher aber ist, daß es sich um Hydroxyd handelt, da die Membran auch gleichzeitig die Grenzfläche zwischen der sauren Suspensionslösung und dem neutralen Zellinnern darstellt. Möglicherweise ist diese Bleieinlagerung für die adstringierende Wirkung der Bleisalze von Bedeutung. Die abgebildeten, *nicht* nachfixierten Membranen zeigen nämlich die typischen Falten einer mechanisch verfestigten Membran. Allerdings kann dies auch eine Folge der p_H-Verschiebung sein. Bei den Zellen, die lediglich Oberflächenadsorptionen von Bleiteilchen aufwiesen, war eine derartige Beeinflussung nicht nachweisbar. Neben dieser Einlagerung von Blei in die Membranen war in denselben Präparaten, oft an denselben Zellen, auch eine *Oberflächen*adsorption feiner Bleipartikelchen aufgetreten.

5. Schlußbetrachtung.

Obwohl jedes der drei untersuchten Metallsalze zu besonderen Erscheinungen an der Erythrozytenmembran führt, lassen sich die einzelnen Befunde ohne Schwierigkeit in die Vorstellungen eingliedern, die wir an sich von der Wirkungsweise adstringierender und ätzender Stoffe haben. Bei der Ätzung wird die Struktur einer Oberfläche zerstört und dafür eine Oberflächenschicht anderer Form geschaffen (das gilt ebenso

für Metalloberflächen wie für Schleimhäute). Klassische Ätzmittel sind starke Alkalien, die zur Kolliquation sowie die Säuren, die zur Säurekoagulation führen. Auch das Sublimat reagiert mit dem Eiweiß unter Entfaltung sehr starker Bindungskräfte, wobei sich dessen Struktur grundsätzlich ändern kann. Unser Modell, die Erythrozytenmembran wird dadurch in ihrem Feinbau gestört, sie wird durchlässig und die Zelle schließlich „abgetötet". Dieselbe Wirkung, nicht an der Einzelzelle, sondern an einem Zellverband als Oberflächenwirkung, nennen wir somit mit Recht Ätzung. Anders verhält sich die Adstriktion: Hier kommt es anscheinend überhaupt nicht zu großen, d. h. übermikroskopisch sichtbaren Strukturänderungen der Zelle, sondern zu einer sich mehr in der Funktion äußernden Änderung der mechanischen und Permeabilitätseigenschaften. Die Zelle bleibt am Leben, d. h. die Adstriktion ist eine Erscheinung am lebenden Plasma, die *nicht auf eine einheitliche chemische Umsetzung* bei allen „Adstringentien" bezogen werden kann.

Auch die Eigenschaften des Sublimats als Fixationsmittel in der Histologie erfahren von diesen Beobachtungen aus Beleuchtung: Bei der Sublimateinwirkung bleibt die äußere Form der Zelle in großen Zügen erhalten, d. h. in den Größenordnungen, die lichtoptisch zugänglich sind. Für eine überlichtoptische Präparation ist es dagegen ungeeignet. Je größer die Sublimatkonzentration ist, je schneller und vollständiger die einzelnen Zellbestandteile reagieren, desto geringer sind die Strukturänderungen (optisch gedacht). Bei nicht ausreichenden Konzentrationen treten die Formveränderungen infolge der Koagulierung an den einzelnen Zellbestandteilen nicht gleichzeitig oder konform auf, so daß Erscheinungen entstehen, wie das Abheben der oberflächlichsten Zellschichten oder gar verschiedenartige Reaktion der einzelnen Zellbestandteile.

Zusammenfassung.

Die Einwirkung von $HgCl_2$ auf isolierte Blutkörperchen wird unter den verschiedensten Bedingungen verfolgt. Hohe Sublimatkonzentrationen fixieren Erythrozyten, wie Erythrozytenstromata ohne wesentliche optische Strukturänderung. Bei geringeren Konzentrationen lassen sich übermikroskopisch alle Stufen einer von außen nach innen fortschreitenden Fixation des Zelleiweißes festhalten. Kleinste Mengen führen zu einer Ausfällung von Hb im Zellinnern unter gleichzeitiger Zunahme der osmotischen Resistenz, größere Mengen zu einer allmählich einsetzenden Hämolyse, die auf einer Denaturierung der Membran beruht. Dann folgt eine Fixation (Koagulation) der oberflächlichsten Zellschichten unter Freiwerden des zentralen Hämoglobinrestes, doch kann diese auch innerhalb der fixierten Membran als ringförmiges Koagulat liegen bleiben. Die Mindestmenge von Sublimat je Zelle, die gerade noch hämolysiert, ist etwa $1{,}2 \cdot 10^{-8}$ Moleküle.

Im Gegensatz zu $HgCl_2$ führt $ZnSO_4$ und $Pb(NO_3)_2$ lediglich zu einer Verfestigung der Membran. Bleihydroxyd und Bleiphosphat wird an Erythrozytenmembranen adsorbiert. Die Einlagerung von Blei in die Membran wurde übermikroskopisch festgehalten.

Literatur.

[1] Jung, F.: Klin. Wschr. **1942**, 917. — [2] Ruska, H.: Dtsch. med. Wschr. **1941**, 281. — Wolpers, C.: Arch. Virusforsch. **2**, 480 (1943). — Naturw. **29**, 416 (1941). — Wolpers, C. u. K. Zwickau: Fol. haemat. (D.) **66**, 211 (1942). — [3] Meneghetti, E.: Biochem. Z. **131**, 38 (1922). — [4] Hooker: Zit. nach Ponder, Protoplasma Monogr. **6** (1934). — [5] Borries, B. v. u. E. Ruska: Erg. exakt. Naturw. **19**, 237 (1940). — [6] Detre u. Sellei: Wien. klin. Wschr. **1904**, 266. — [7] Bechhold, H. u. W. Kraus: Biochem. Z. **109**, 226 (1920). — [8] Wilbrandt, W.: Pflügers Arch. **244**, 637 (1941). — [9] Lepeschkin, E.: Fol. haemat. **65**, 291 (1941). — [10] Aub, Reznikoff and Smith: J. exper. Med. (Am.) **40**, 151 (1924). — [11] Winkler et Bungenberg de Jong: Arch. néerld. Physiol. **25**, 431 (1941). — [12] Wolpers, C.: Klin. Wschr. **1942**, 1049. — [13] Ruska, H.: Unveröffentlicht. — [14] Bohlmann, A.: Arch. exper. Path. (D.) **203**, 317.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin und dem Laboratorium für Übermikroskopie der Siemens & Halske AG., Berlin-Spandau.

Zur Theorie der Chloratvergiftung. III.

Von

Fritz Jung,
z. Z. Würzburg.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. November 1944.)

In den vorhergehenden Mitteilungen[1, 2] war nachgewiesen worden, daß die chlorsauren Salze ihre Giftwirkung über einen autokatalytischen Vorgang entwickeln. Die Umsetzung des Chlorats wird nämlich durch Hämiglobin (Methämoglobin) in Gang gebracht und beschleunigt. Hämoglobin ist aber das wesentlichste Reaktionsprodukt bei der Umsetzung von Chlorat mit Blut. Wir hatten uns bisher auf die Betrachtung der Hämiglobinbildung beschränkt, neben dieser steht aber als zweites und mindestens ebenso gefährliches Hauptsymptom die *Zerstörung der roten Blutkörperchen.*

Nach Marchand[3] und Riess[4] verlieren die Erythrozyten bei der Chloratvergiftung ihr Hämoglobin, dieses sammelt sich zunächst als feinste Körnchen am Rand der Zelle und erscheint später frei im Blutplasma Geschrumpfte und verfaltete, sowie schwerer pathologisch veränderte Blutkörperchen wurden in der folgenden Zeit bei den verschiedensten Tieren vermerkt und demgemäß das Chlorat in die Guppe der hämolytischen und Heinz-Körperchen bildenden Gifte eingereiht (Lange[5], Nickel[6], Isambert[7]). Allerdings beziehen sich alle Beobachtungen über Blutkö. perchenveränderungen auf spätere Stadien der Vergiftung. Marchand[3] bemerkt z. B., daß im Stadium der primären Blutveränderung (Hämiglobinbildung) niemals Hämolyse eintrete. Lediglich geringgradige Formveränderungen der Zellen können unter Umständen sichtbar werden. Eingehendere Untersuchungen, etwa eine Überprüfung der osmotischen Eigenschaften der Erythrozyten im Verlauf einer Chloratvergiftung, liegen nicht vor. Wie im folgenden gezeigt werden soll, lassen sich auch die Blutkörperchenveränderungen auf Grund der chemischen Eigenschaften des Chlorats und des Hämoglobins erklären. Die weiteren, von den einzelnen Autoren beschriebenen Veränderungen der Niere und der Milz sind — wie ein Vergleich mit anderen hämolytischen Giften (etwa dem Arsenwasserstoff) lehrt — Folgen der Hämolyse, somit keineswegs spezifische Chloratwirkungen.

I. Beobachtungen in vitro.

Marchand[3] und Jäderholm[8] fanden, daß Blut beim Zusatz von Chlorat seine Farbe wie seine Konsistenz ändert, es wird zähflüssig und gallertartig, so daß man schließlich das Gefäß umkehren kann, ohne daß etwas ausfließt. Im Verlauf dieses Vorgangs werden die Umrisse der Erythrozyten unscharf, an den Zellrändern zeigen sich stark lichtbrechende Körnchen, schließlich kommt es zum körnigen Zerfall der Zelle[3,5,6]. Auch Nickel[6] machte diese Beobachtung, er fügte jedoch hinzu, daß sie bei Hämoglobinlösungen nicht eintrete. Nach unseren Beobachtungen jedoch vermag Chlorat Bluthämolysate auszuflocken und auch zu gelatinieren. Voraussetzung für die letztgenannte kolloidchemische Veränderung ist, wie Nickel entgangen war, eine leicht alkalische Reaktion und eine nicht allzu verdünnte Lösung.

Beim Zerfall des Chlorats entstehen demnach nicht nur Stoffe, die Hämoglobin in Hämiglobin überführen, sondern auch Hämoglobineiweiß denaturieren können. Ob bei dieser oxydativen Denaturierung des Globins grobe Flockungen oder eine Gelatinierung auftritt, ist von äußeren Umständen abhängig.

Seinerzeit[2] wurde gezeigt, daß sich aus dem Reaktionsgemisch Chlorat-Hämoglobin durch Ultrafiltration kein aktives Chlor abtrennen läßt. Die aus dem Chlorat entstehenden rasch vergänglichen Zerfallsprodukte werden nur in der engsten räumlichen Nachbarschaft ihrer Bildung wirksam und diffundieren nicht ab. Dasselbe gilt für die einzelne Blutkörperchenzelle, deren Membran ebenfalls als Ultrafiltermembran aufzufassen ist. Wie gezeigt wurde[1], läuft auch tatsächlich die Reaktion in den einzelnen Erythrozyten einer Suspension mit verschiedener Geschwindigkeit. Es ist somit unwahrscheinlich, daß im Blutserum oder der Suspensionsflüssigkeit oxydative Wirkungen des Chlorats auftreten.

II. Beobachtungen im Tierversuch.

Als Versuchstiere dienten Katzen. Außer der bereits beschriebenen Hämiglobinbildung[2] wurde der Hämoglobingehalt des Blutes, die Heinz-Körperchen und sonstige Blutkörperchenveränderungen (mit Hilfe der „Vitalfärbung"), die osmotische Resistenz der Zellen (mittels einer kolorimetrischen Methode) und die übermikroskopische Struktur der roten Blutzellen (mittels des Übermikroskops nach E. Ruska und B. v. Borries[9]) verfolgt.

Hinsichtlich der Hämiglobinbildung waren zwei grundsätzlich verschiedene Verlaufsformen der Vergiftung unterschieden worden. Ist durch eine geringgradige Vorvergiftung, etwa mit $NaNO_2$, der „Katalysator" Hämiglobin in sämtlichen Blutzellen erzeugt worden, so läuft die Vergiftung schnell an und führt innerhalb von 2 Stunden zum Tod des Tieres

an innerer Erstickung. Kann dagegen nur das natürlich in den Zellen vorhandene Hämiglobin als Katalysator wirken, so erhält man einen sehr wechselnden Verlauf der Vergiftung und eine unter Umständen nur sehr mäßige Hämiglobinbildung.

a) Die Vorgänge bei einem vorvergifteten Tier sind in Abb. 1 dargestellt (derselbe Versuch ist auch als K 6 in der II. Mitteilung aufgenommen). Gegen jede Erwartung nahmen im Laufe der Vergiftung die HEINZ-Körperchen,

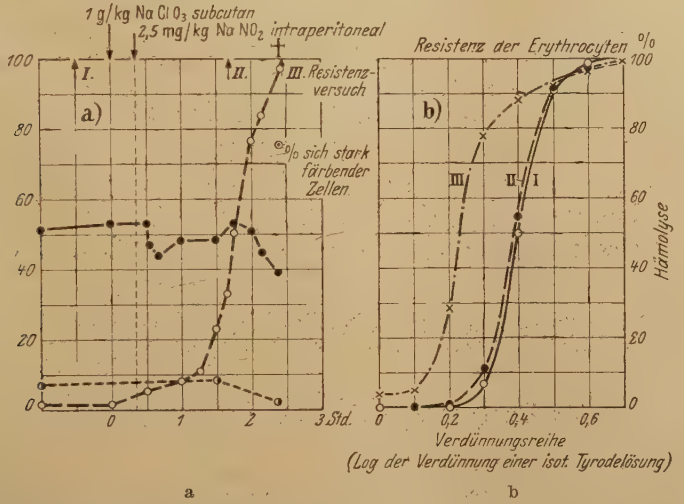


Abb. 1 a u. b. Chloratvergiftung einer Katze ($NaNO_2$ vorvergiftet). a Abszisse: Zeit in Stunden. Ordinate: ●—●—●: Hämoglobin in Val. 10^{-4}. o—o—o: Hämiglobin in Prozent des Hämoglobins. ◐———◐———◐: HEINZ-Körperchen in Prozent befallener Erythrozyten. ⊙ Einzelwert: Prozent sich diffus färbender Erythrozyten (vgl. Text). b Resistenzversuch zu den durch Pfeile I, II und III in a bezeichneten Zeitpunkten. Bezeichnung an der Kurve.

die beim Versuchstier, wie den meisten Katzen, von vorneherein in geringer Menge anwesend waren, nicht zu, sondern ein wenig ab. Dafür aber wurde etwa 1 Stunde nach der Nitritverabreichung bemerkt, daß fast alle Erythrozyten den blauen Farbstoff viel besser annahmen und schließlich im Vitalpräparat kräftig blau gefärbt erschienen, während sonst im allgemeinen eine normale Zelle nur blaßblau tingiert wird. Sonst zeigten die Zellen keine Veränderung von Form und Färbbarkeit.

Dieosmotische Resistenz der Zellen war bei einer etwa 33% Umwandlung des Blutfarbstoffs kaum und erst beim Tode des Tieres erheblich verändert. Spontanhämolyse trat nicht auf. Die Resistenzverminderung hatte alle Zellen des Blutes in gleicher Weise erfaßt, denn die Kurve III auf Abb. 1 ist parallel zu den beiden anderen ins Gebiet höherer Salzkonzentration verschoben. Gegen Ende des Versuches setzte eine deutliche Abnahme des Gesamthämoglobins ein. Bis kurz vor dem Tode hämolysierte das Blut des Tieres vollständig klar, die nach dem Tode entnommene Probe hinterließ

nach Hämolyse und Zentrifugierung einen kräftig braun gefärbten Stromaniederschlag. In den Erythrozyten befand sich somit denaturierter Blutfarbstoff. Dieser war auch bei der übermikroskopischen Untersuchung nachweisbar, dagegen keine groben Membranveränderungen. Die beim Tode entnommene Blutprobe mußte sehr schnell chloratfrei gewaschen werden, da sie sich weiter veränderte und in ganz kurzer Zeit zu einer Gallerte erstarrte.

Der pathologische Prozeß ist von den Versuchen in vitro her leicht zu verstehen. Ebenso wie dort tritt in den späteren Stadien der Chloratumsetzung eine Wirkung am Hämoglobineiweiß hervor. Diese äußert sich zunächst in einem erhöhten Adsorptionsvermögen des Erythrozyten für den Farbstoff, später auch in sichtbarer Ausfällung des Globins innerhalb der roten Blutzelle. Erst wenn der Denaturierungsprozeß auf die Membran übergreift, kommt es zu einer Hämolyse durch den Austritt noch wasserlöslicher Hämoglobinanteile ins Blutserum.

b) Die Vorgänge bei einer unbeeinflußten Chloratvergiftung zeigt Abb. 2 (es handelt sich um K 2 aus der II. Mitteilung). Infolge der längeren Versuchsdauer kam hier die Abnahme der Heinz-Körperchen sehr viel deutlicher heraus. Wiederum traten diffus vitalfärbbare Erythrozyten im Blute auf, doch diesmal nicht sofort in großer Zahl, sondern erst nur wenige, dann immer mehr. Man sieht, daß die Zunahme der veränderten Zellen der Hämiglobinbildung ziemlich parallel geht. Das kam in den anderen Versuchen fast noch deutlicher heraus. Bei den Katzen K 4 und K 5 aus der II. Mitteilung, die nur geringfügig Hämiglobin gebildet hatten, waren z. B. nur ganz vereinzelte derartige Zellen sichtbar. Die Bluthämolysate wurden in allen Versuchen schon im Anfang der Hämoglobinbildung trübe und bei etwa 30% Hämiglobin war im vorgelegten Versuch auch der Stromniederschlag kräftig braun gefärbt und mußte somit bereits erhebliche Mengen denaturierten Farbstoffs enthalten. Der Gesamthämoglobingehalt sank in fast allen Versuchen laufend ab. Lediglich bei einer Katze (K 5) trat keine wesentliche Veränderung ein.

Im Serum war Spontanhämolyse aufgetreten. Aus dem Verlauf der Resistenzkurve (Abb. 2b) kann man entnehmen, daß $7^1/_2$ Stunden nach Versuchsbeginn etwas weniger als die Hälfte der roten Blutzellen noch durchaus die normale osmotische Resistenz besaß, während der Rest zum Teil spontan hämolysierte, zum Teil bereits in den Anfangsstufen der Verdünnungsreihe zerfiel. Um dies Ergebnis deutlicher zu machen, ist in Abb. 2b eine theoretische Kurve (III) eingetragen, die sich ergeben würde, wenn 50% der Zellen spontan hämolysierten und der Rest eine normale Resistenz hätte. Es liegt nahe, anzunehmen, daß die Zellen, welche bei der Vitalfärbung sich normal verhielten, auch eine normale Resistenz besaßen, während die stark färbbaren in der Resistenz abnahmen oder zum Teil ihr Hämoglobin spontan verloren haben.

Zu Versuchsende wurde einem noch lebenden Tiere eine größere Menge Blut entnommen. Das stark hämolytische Serum wurde abgetrennt und der Erythrozytenbrei in einer etwa 0,7% Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Dabei lösten sich die weniger resistenten Zellen. Schließlich kam der Rest des Zellbreis in destilliertes Wasser, aus welchem sich dann die Stromata durch Zentrifugieren abscheiden ließen. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihren Hämiglobingehalt untersucht:

Es enthielt:

Serum	100%
die weniger resistenten Zellen .	78%
die Zellen normaler Resistenz	62%
ihres Hämoglobins als Hämiglobin.	

Im Stromaniederschlag befanden sich neben reichlich Hämiglobin etwas Hämatin und Verdoverbindungen, dagegen gar kein Hämoglobin.

Die ungeschädigten Zellen dürften somit erheblich weniger Hämiglobin enthalten als die geschädigten. Aus all diesem folgt notwendig, daß die Hämiglobinbildung und der weitere Zerstörungsprozeß nicht in allen Zellen gleichmäßig vor sich geht, sondern in einigen wesentlich schneller, in anderen langsamer oder zunächst gar nicht. Würde die Umsetzung in der

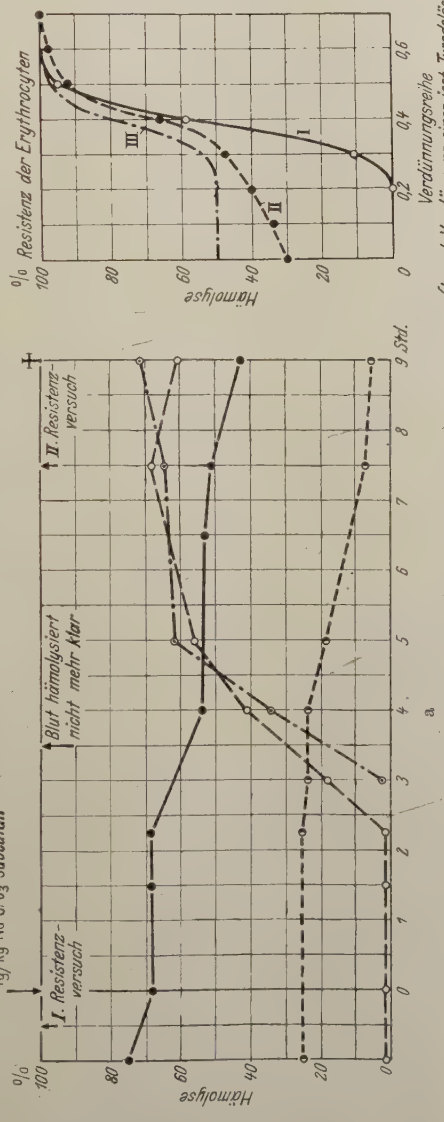


Abb. 2 a u. b. Chloratvergiftung einer Katze.

a Abzisse: Zeit in Stunden. Ordinate: ●—●—●: Hämoglobin in Val. 10^{-4}, o—o—o: Hämiglobin in Prozent des Hämoglobins. ◑—·—·—◑: HEINZ-Körperchen in Prozent befallener Erythrozyten. ○—·—○—·—○: Prozent sich diffus färbender Erythrozyten (vgl. Text). b Resistenzversuch zu den durch Pfeile I und II in a bezeichneten Zeitpunkten. Kurve III vgl. Text. Bezeichnungen an der Kurve.

Masse des Blutes stattfinden, so wäre nicht einzusehen, warum in derselben Blutprobe sich die einzelnen Zellen so verschieden verhalten. Der Verlauf der Umsetzung in vivo entspricht somit genau den Verhältnissen in vitro, bei denen wir wahrscheinlich machen konnten — durch Modellversuch und Auswertung einzelner Versuchsergebnisse —, daß das Chlorat nur innerhalb der roten Blutzelle zerfällt und daß seine Zerfallsprodukte nur in dieser, also in unmittelbarer Nachbarschaft seiner Bildung wirksam werden. Selbstverständlich wird dies in dem Augenblick anders, in welchem die ersten Erythrozyten hämolysieren und somit Hämiglobin ins Serum gelangt.

Abb. 3. Fast unveränderter Katzenerythrozyt bei Chloratvergiftung (osmiumfixiert).

Die Abnahme der HEINZ-Körperchen im Verlaufe des Versuchs deutet darauf hin, daß HEINZ-Körperchen tragende Zellen bevorzugt dem Angriff des Chlorats erliegen. Wir müssen ferner annehmen, daß diejenigen Zellen, die schneller reagieren, mehr Hämiglobin enthalten als die anderen. Dieses sog. „normale" Hämoglobin ist bereits im Blute nachgewiesen worden (vgl. HEUBNER[13]). Allerdings gibt es keine Methode, mit der man etwa wechselnde Mengen in den einzelnen Blutzellen aufzeigen könnte. Vielleicht ist nun der Schluß erlaubt, daß die HEINZ-Körperchen tragenden Zellen mehr Hämiglobin enthalten als die anderen und man könnte von hier aus sich Gedanken über die Vorgänge machen, die in einer roten Blutzelle eintreten, so sie altert. Wie die Abnahme des Gesamthämoglobins in allen Versuchen zeigt, wird ein Teil der geschädigten Zellen laufend aus dem Blute entfernt.

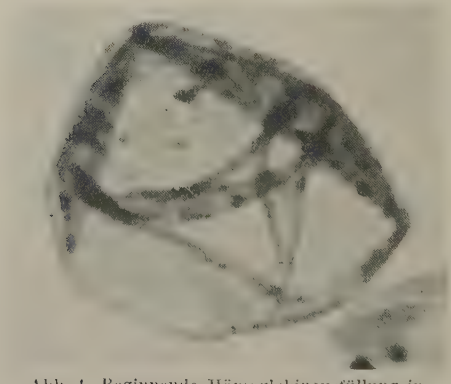


Abb. 4. Beginnende Hämoglobinausfüllung im Zellinnern (osmiumfixiert).

Im Blute der Tiere finden sich die veränderten Zellen in allen möglichen Stadien; einzelne Blutproben wurden übermikroskopisch untersucht. Die Präparationstechnik ist bereits an anderer Stelle geschildert worden[10].

Zur Darstellung kommen die vom löslichen Hämoglobin freigewaschenen Stromata, die durch Osmiumfixation etwas kontrastreicher gemacht werden können. Die Verg ößerung beträgt etwa 1:10000. Abb. 3 zeigt eine noch kaum veränderte Erythrozytenmembran einer Katze, Abb. 4 dagegen das typische Bild einer teilweisen Ausfällung von Hämoglobin im Zellinnern, das C. Wolpers[10] seinerzeit auch als partielle Hämolyse beschrieben hat. Es handelt sich, wie die an sich scharfe Aufnahme deutlich zeigt, um ganz diffuse, „weiche" Ausfällungen des Hb, die sich nirgends in scharf abgegrenzten Flocken oder Koagula absetzen. Die Ausfällung

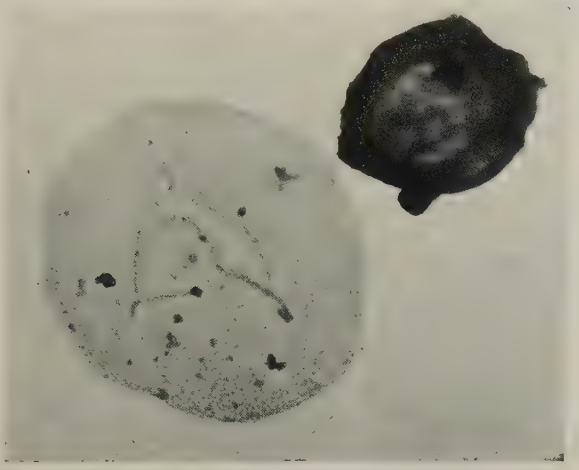


Abb. 5. Vollständige Ausfüllung des Hb und Schrumpfung der Zelle, daneben unveränderte Zelle (unfixiert).

wird mit zunehmender Vergiftung immer dichter, um schließlich zu einer vollständigen „Fixation" des Hämoglobins im Zellinnern zu führen. Gleichzeitig schrumpft die Zelle. Dies kommt in Abb. 5 an unfixierten Zellen sehr deutlich heraus. Die Abbildung zeigt eine noch normal gebliebene Membran, neben einer vollständig geschrumpften Zelle, mit großen Mengen denaturierten Blutfarbstoffs im Innern. Leider läßt das ausgefüllte Hämoglobin etwaige Veränderungen der Erythrozytenmembran nicht mehr in Erscheinung treten.

Genau dieselben Blutkörperchenveränderungen wie an der Katze wurden an der Ratte beobachtet; auch hier kam es bei Chloratvergiftung zu diffusen Anfärbungen der ganzen Zellen bei „Vitalfärbung". Th. Becker hat in einigen noch nicht veröffentlichten Versuchen außerdem gezeigt, daß bei Ratten das Auftreten dieser Zellveränderung genau so wie die Hämiglobinbildung durch eine gleichzeitige Nitritgabe hervorgerufen werden kann. Das Auftreten von typischen Heinz-Körperchen wurde jedoch auch bei der Ratte niemals beobachtet.

Die geschilderten Befunde an Erythrozyten scheinen sich in keiner Weise an die sonstigen Ergebnisse der Literatur anzuschließen, da in dieser immer wieder über Hämoglobinschollen und Körnchen innerhalb der Erythrozyten berichtet wird. Das liegt an der kurzen Beobachtungsdauer in all unseren Versuchen. Lediglich in zwei Fällen überlebte ein Tier die Vergiftung längere Zeit und gab uns so Gelegenheit, das weitere Schicksal der veränderten Blutzellen zu verfolgen. Bereits am nächsten Tag sind die Erythrozyten nicht mehr diffus stark vitalfärbbar, sondern das „Substrat" der Vitalfärbung hat sich in mehrere Stücke geteilt bzw. in eine Scholle zusammengezogen, die innerhalb der Zelle liegt. Unter Umständen können auch viele Körnchen vorhanden sein. Wenn es erlaubt ist, aus einem Einzelfall einen Schluß zu ziehen, so hat sich das „Hämoglobingel" innerhalb der Zelle weiter verändert, es hat sich retrahiert und ist zu einem Körperchen geworden, das man unter Umständen als Heinzsches Körperchen bezeichnen könnte. Während die von uns hier beschriebenen Zellveränderungen bei direkter Betrachtung des Blutes oder bei Färbungen fixierter Präparate nicht sichtbar werden, muß nunmehr die inhomogen gewordene Zelle bereits ungefärbt auffallen. Somit erklärt sich, daß Marchand[3] die in unserem Sinne bereits aufs schwerste veränderten Zellen lediglich als etwas zerknittert und gefaltet beschreibt, ohne das Wesen des Prozesses zu durchschauen.

Nachgetragen soll noch werden, daß genau so wie in vitro auch in vivo in den späteren Stadien der Chloratvergiftung Verdoverbindungen nachzuweisen sind. In den hier geschilderten Versuchen an Katzen ist der Gehalt des Blutes an Verdoglobin etwa auf das doppelte angestiegen (Bestimmung nach Kiese[11]). Wie Kiese in inzwischen veröffentlichten Versuchen an Hunden und Ratten zeigte, kommt es auch bei diesen zu einer Vermehrung des Verdoglobins. Ebenso wie er, konnte ich infolge der geringen Konzentrationen eine nähere Festlegung der auftretenden Verdoverbindung nicht durchführen. Auch Hämatin konnte ich entsprechend den früheren Beobachtungen von Feigl[12] in vivo nachweisen. Beide Erscheinungen aber finden genau so in vitro statt, stellen somit kein besonderes Problem für die Chlorat*vergiftung* dar.

Zusammenfassung.

Chlorsaure Salze reagieren nach Aufnahme ins Blut lediglich innerhalb der Blutkörperchen. Das Hämoglobin derselben wird hierbei zunächst durch den früher beschriebenen autokatalytischen Prozeß in Hämiglobin übergeführt; gegen Ende dieser Umwandlung kommt es infolge mehr und mehr in Erscheinung tretender Nebenreaktionen zu einer oxydativen Denaturierung des Eiweißes (Globin), wobei dies als Gel innerhalb der Zelle unlöslich wird. Beim weiteren Fortschreiten des Prozesses wird auch das Stroma mitgeschädigt, was zum Auslaufen von noch nicht ausgefälltem

Hämoglobin und somit zu einer Hämoglobinämie Anlaß gibt. Je nach den Vergiftungsbedingungen und nach dem Zustand des Tieres werden alle oder ein wechselnder Teil der Erythrozyten von diesem Vorgang erfaßt.

Die fortschreitende Zerstörung des Erythrozyten läßt sich im Vitalpräparat an einer zunehmenden diffusen Anfärbbarkeit durch Nilblausulfat usw. nachweisen; übermikroskopisch ist sie direkt an der Ausfällung des Blutfarbstoffs innerhalb der Zelle zu erkennen und offenbart sich in den späteren Stadien auch im Resistenzversuch. Besondere Umsetzungen des Chlorats im Tierkörper finden nicht statt, die für den pathologischen Prozeß wesentlichen Einzelreaktionen laufen vielmehr in vitro genau so ab wie in vivo.

Die bei der Chloratvergiftung auftretenden „Heinz-Körperchen" entstehen nicht direkt durch die Gifteinwirkung, wie etwa beim Phenylhydrazin, sondern erst infolge sekundärer Veränderungen des innerhalb der Zelle ausgeflockten Hämoglobins.

Literatur.

[1] Heubner, W. u. F. Jung: Schweiz. med. Wschr. **71**, 27 (1941). — Ber. dtsch. chem. Ges. **75**, 1636 (1942). — [2] Becker, Th., F. Dordoni u. F. Jung: Arch. exper. Path. (D.) **201**, 197 (1943). — [3] Marchand: Virchows Arch. **77**, 473 (1897). — Arch. exper. Path. (D.) **23**, 285 (1887). — [4] Riess: Berl. klin. Wschr **1882** I, 785. — [5] Lange: Med. Klin. **1909**, 1929. — [6] Nickel: Studien über die Blutwirkung der Chlorate. Diss. Göttingen 1921. — [7] Isambert: Gaz. méd. Par. **1875**. — [9] Jäderholm: Z. Biol. **13**, 228 (1877). — [8] Ruska, E. u. B. v. Borries: Erg. exakt. Naturw. **19**, 237 (1940). — [10] Wolpers, C. u. K. Zwickau: Fol. haemat. (D.) **66**, 211 (1942). — [11] Kiese: Klin. Wschr. **1942**, 565. — Arch. exper. Path. (D.) **200**, 648 (1943). — [12] Feigl: Biochem. Z. **74**, 394 (1916). — [13] Heubner, W.: Erg. Physiol. usw. **43**, 9 (1940).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Leipzig (Direktor: O. Gros).

Diureseversuche an Ratten und Kaninchen mit Harnstoff und Harnstoffderivaten.

Von

Hans T. A. Haas.

(Eingegangen am 8. Juli 1944.)

Der Harnstoff wird jetzt nur selten als Diuretikum verwandt, da andere Mittel bei den gleichen Indikationen im allgemeinen mehr leisten. Außerdem wird der Harnstoff wegen seines schlechten Geschmackes nur ungern eingenommen. Gerade dieser Umstand ist nicht unerheblich, da vom Harnstoff zur Erzielung einer Diurese größere Mengen gegeben werden müssen. Trotzdem hat er bei der Behandlung von Leberkranken und bei Nephrosen einen gewissen Platz in der Therapie behaupten können, und er hat sogar in den letzten Jahren erneut eine Reihe von Befürwortern gefunden[1–5].

Im Rahmen der früheren Diureseversuche[6], bei denen innerhalb der Purinkörperreihe Beziehungen zwischen Konstitution und Wirksamkeit geprüft wurden, haben wir uns auch die Frage vorgelegt, ob durch bestimmte Harnstoffderivaten die Diurese verstärkt werden kann*. Es wurden deshalb im Vergleich zum Harnstoff eine Reihe nahe verwandter, ihrer chemischen Konstitution nach bereits bekannter Verbindungen auf ihre diuretische Kraft untersucht. Über diese Substanzen liegen bisher pharmakologische Untersuchungen in dieser Richtung noch nicht vor.

Auch diese Untersuchungen wurden an einem einheitlichen Tiermaterial durchgeführt, um so unter möglichst gleichartigen Bedingungen die Bedeutung der Änderung der chemischen Konstitution näher festzulegen. Soweit die geprüften verschiedenen Verbindungen diuretische Eigenschaften besaßen, zeigten sie alle in den wirksamen Grenzkonzentrationen eine Förderung der Harnabsonderung etwa von der gleichen Größenordnung. Unterschiede bestanden bei den einzelnen Substanzen

[1] Nonnenbruch: Münch. med. Wschr. **1936 I**, 629. — [2] Duesberg: Med. Welt **1934 I**, 410. — [3] Weese: Münch. med. Wschr. **1934 II**, 1857. — [4] Schiessl: Münch. med. Wschr. **1937 I**, 220. — [5] Erkkelentz u. Wotzka: Ther. Gegenw. **1935**, 529. — [6] Haas: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **201**, 589 (1943).

* Von Herrn Prof. Becher lagen bereits Untersuchungen mit einem alkylierten Harnstoffabkömmling am Menschen vor, die einen günstigen Einfluß auf die Diurese ergeben hatten. Diese Untersuchungen bildeten den eigentlichen Ausgangspunkt der vorliegenden Versuchsreihen.

hinsichtlich der Dosen, die im Vergleich zum Harnstoff zur Erzielung eines gleich starken diuretischen Effektes notwendig waren. Ein Maß für die vergleichende Beurteilung der Wirkstärke bot sich somit in der Höhe der Dosen, die zur Erzielung einer deutlichen Diurese bei den einzelnen Harnstoffderivaten benötigt wurden.

Methodik.

Die Diureseversuche wurden wiederum an weißen Ratten durchgeführt. Insgesamt wurden 36 Tiere für alle Untersuchungsreihen benutzt. Hierbei standen stets 6 Gruppen zu je 3 Tieren im Einzelversuch. Vor und während der gesamten Versuchsdauer wurden alle Tiere mehrmals (4- bzw. 5mal) einem Leerversuch ohne Zugabe von Diuretika unterworfen. Die Technik der Versuche war im übrigen die gleiche wie bei den früheren Untersuchungen[6]. Sie unterschied sich von diesen nur insofern, als bei den jetzigen Versuchsreihen die Tiere jeweils physiologische Kochsalzlösung in einer Menge von 5 ccm/100 g Körpergewicht am Tage vor dem eigentlichen Versuch und am Versuchstage selbst erhielten. In dieser Flüssigkeitsmenge wurden auch die Diuretika in mg/100 g Körpergewicht aufgelöst.

Außerdem wurden noch vergleichende Versuche an Kaninchen vorgenommen. Auch bei diesen wurden stets die gleichen Tiere in allen Untersuchungsreihen benutzt. Insgesamt standen 19 Tiere zur Verfügung. 4 Kaninchen mußten im Laufe der Versuche ausgeschieden werden, da nach der Zufuhr des Tetramethyl-Methylen-Harnstoffes deutliche Schädigungen der Tiere eintraten. Die Mehrzahl der Versuche mußte somit an 15 Tieren durchgeführt werden. Methodisch wurde Wert darauf gelegt, daß auch in den Kaninchenversuchen etwa gleichartige Versuchsbedingungen wie bei den Rattenversuchen eingehalten wurden. Nach einem Vorschlag von Vollmer und Hindemith[7] wurden die Tiere längere Zeit vor Beginn der Versuche und auch während der ganzen Untersuchungsdauer mit einer wasserreichen Kost ernährt. Diese bestand ausschließlich aus Futterrüben und einer Zulage von etwas Heu. Es wurden also auch in den Kaninchenversuchen ähnlich wie bei den Ratten Tiere mit möglichst aufgefüllten Wasserdepots verwendet. Praktisch erhielten die Tiere 12 Tage vor dem Versuchsbeginn und während der ganzen Versuchsdauer täglich 300 g Futterrüben. An den versuchsfreien Tagen wurde dazu noch Heu verfüttert. Am Versuchstage selbst wurden den Tieren außerdem 30 ccm physiologische Kochsalzlösung mit der Schlundsonde zugeführt. Dieser Flüssigkeitsmenge wurden die verschiedenen Harnstoffabkömmlinge zugesetzt, jeweils berechnet nach dem Gewicht der Tiere im mg/100 g. Nach der Zufuhr der physiologischen Kochsalzlösung bzw. der Harnstoffverbindungen blieben die Tiere

[7] Vollmer u. Hindemith: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **186**, 565 (1937).

24 Stunden lang im Diuresekäfig. Gleichzeitig erhielten sie auch am Versuchstage 300 g Futterrüben. Vor und nach dem Versuch wurde katheterisiert. Das gleiche Tier kam nur einmal in jeder Woche in den Versuch. Durch die Untersuchung des Harnsedimentes überzeugten wir uns außerdem vor Beginn jedes Versuches davon, daß die Tiere keine pathologischen Beimengungen mit dem Harn ausschieden. Ebenso wurde bei den Kaninchen während des Diureseversuches und nach seinem Abschluß das Harnsediment laufend mikroskopisch untersucht. Ferner wurde bei den Tieren noch das Gewicht vor Beginn und nach Beendigung des 24stündigen Diureseversuches gemessen.

1. Kontrollversuche.

Die Ergebnisse der Diureseversuche ohne Belastung der Tiere mit Harnstoff bzw. den verschiedenen Harnstoffabkömmlingen sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt. Diese enthält bei den Rattenversuchen die

Tabelle 1.

Tierart	Zahl der Versuche	Ausgeschiedene Harnmengen in ccm/kg	Gewichtsabnahme in g nach 24 Std.
Ratten (Serie IV) .	162	35,6 ± 2,2 (8 Std.-Versuche)	
Kaninchen	38	283,0 ± 8,2 (24 Std.-Versuche)	39 g ± 11,1

Tierart	Zahl der Versuche	Ausgeschiedene Harnmengen in % der zugeführten Flüssigkeitsmengen						Katheterharn
		n. 1 Std.	3 Std.	6 Std.	8 Std.	9 Std.	24 Std.	
Ratten (Serie IV) .	162	31,5	55,5	67,8	71,3	—	—	—
Kaninchen	38	—	10,7	46,3	—	58,7	79,7	94,3

nach Ablauf von 8 Stunden entleerten Harnmengen. Bei den Kaninchen beziehen sich die gleichen Angaben auf die in 24 Stunden spontan ausgeschiedenen Urinmengen zusätzlich der Harnmengen, die mit dem Katheter nach Ablauf von 24 Stunden gewonnen wurden. Alle Werte sind berechnet in ccm/kg Körpergewicht. Außerdem sind in der Tabelle bei den Rattenversuchen noch die nach 1, 2, 6 bzw. 8 Stunden ausgeschiedenen Harnmengen eingefügt. Diese sind berechnet in Prozent der zugeführten Gesamtflüssigkeitsmenge. Bei den Kaninchenversuchen finden sich die entsprechenden Angaben für die nach 3, 6, 9 bzw. 24 Stunden ausgeschiedenen Flüssigkeitsmengen. Wenn bei den Kaninchenversuchen im Gegensatz zu den Rattenversuchen die Harnausscheidung in den ersten Stunden verhältnismäßig gering ausfiel, so erklärt sich dies damit, daß die Kaninchen erst im Laufe des Versuches nach dem Verzehren der Futterrüben die gesamte Flüssigkeitszufuhr des Tages zugeführt bekamen. Eine weitere Spalte enthält die Urinmengen, die erst

mittels des Katheters bei den Kaninchen entleert wurden. Bei der Berechnung der Prozente an ausgeschiedenen Harnmengen wurde die gesamte Flüssigkeitszufuhr von 300 ccm pro Tag zugrunde gelegt. Diese setzt sich aus der zugeführten Rübenmenge von 300 g mit etwa 90% Wassergehalt zusammen, zu der noch die 30 ccm Kochsalzlösung hinzukommen. Tatsächlich enthielten die benutzten Futterrüben einen Wassergehalt von 89,7—93,1%.

Bei den einzelnen Mittelwerten sind in der Tabelle noch jeweils die entsprechenden Fehlerbreiten hinzugefügt. Diese wurden nach den üblichen statistischen Verfahren[8] berechnet. Außerdem wurden bei den Untersuchungen mit den verschiedenen Harnstoffderivaten noch die Abweichungen vom Leerversuch statistisch ausgewertet. Soweit sich hierbei einwandfreie Unterschiede gegenüber den Leerwerten fanden, ist dies in den Tabellen durch einen Fettdruck der betreffenden Mittelwerte und ihrer Fehlerbreiten gekennzeichnet.

Bei den Rattenversuchen liegen die Mittelwerte der im Leerversuch entleerten Harnmengen etwas höher als in den früheren Beobachtungsreihen (I—III[6]). Dies erklärt sich durch die vorgelegte höhere Flüssigkeitsmenge, die im Gegensatz zu den früheren Versuchen statt 4 ccm jetzt 5 ccm betrug. Trotzdem liegen auch bei dieser Versuchstechnik die Harnmengen zu den bestimmten Ablesungszeiten, wenn man sie in Prozent der gesamten zugeführten Flüssigkeitsmenge berechnet, innerhalb der Schwankungsbreite der früheren Untersuchungsreihen.

2. Beeinflussung der Diurese durch Harnstoff und Harnstoffderivate.

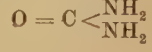
Im Anschluß an diese Vorversuche wurden die eigentlichen Untersuchungen unter Belastung der Tiere mit Harnstoff bzw. den verschiedenen Harnstoffabkömmlingen durchgeführt. Die Formelabbildung enthält eine Übersicht über die chemische Beschaffenheit der gewählten Substanzen. Bei diesen handelt es sich abgesehen vom Harnstoff selbst einmal, um substituierte Harnstoffverbindungen mit Einfügung zweier Methyl- bzw. Oxyäthylgruppen. Daneben wurden Hydantoin bzw. ein methyliertes Hydantoin und die Ureidoessigsäure geprüft. Dazu kamen weiter zwei Abkömmlinge des Dicyandiamidins. Schließlich wurden noch Diharnstoffverbindungen vom Typ des Biuret, des Tetramethyl-Methylen-Harnstoffes und des Triaceton-Diharnstoffs untersucht. Endlich kam noch ein Abkömmling der Malonsäure, das Malonsäurediamid zur Untersuchung.

Die Tabelle 2 enthält die an Ratten und Kaninchen erzielten Resultate. Bei der Ureidoessigsäure, bei Biuret, Triacetonharnstoff sowie beim Hydantoin mußten wir uns in den Kaninchenversuchen auf die Prüfung relativ schwach konzentrierter Lösungen beschränken, da die schlechte

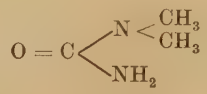
[8] Fisher: Statist. Method. Res. Workers. Edinburgh 1925.

Löslichkeit dieser Verbindungen die Anwendung höherer Konzentrationsbereiche nicht gestattete.

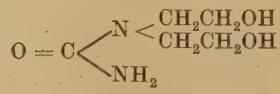
Harnstoff:



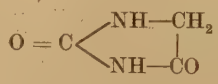
Dimethylharnstoff:



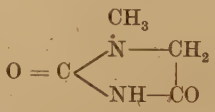
Di(p-oxyäthyl)-Harnstoff:



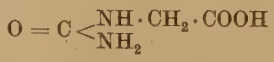
Hydantoin:



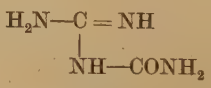
1-Methyl-Hydantoin:



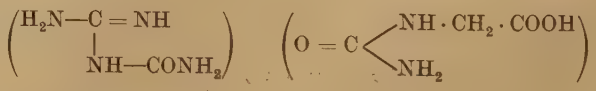
Ureidoessigsäure:



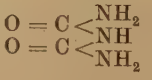
Dicyandiamidin (Guanylharnstoff) als neutral. Zitratsalz:



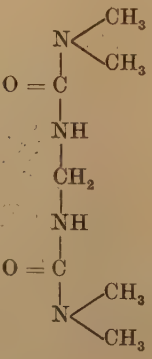
Ureidoacetat d. Dicyandiamidin:



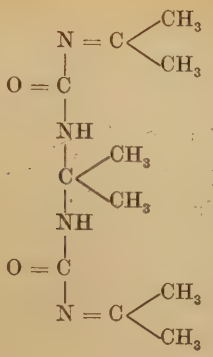
Biuret:



N_1N_1-N_2N_2'-Tetramethyl-Methylen-Harnstoff:



Triaceton-Diharnstoff:



Malonamid:

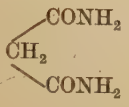


Tabelle 2a. *Diureseversuche an Ratten.*

Substanz	Zahl der Versuche	Dosis in mg/100 g	1000/mol	Harnmenge in ccm/kg
Harnstoff	18	50	0,83	37,0±2,6
	18	100	1,66	**44,8±3,9**
Dimethylharnstoff	36	25	0,28	34 9±1,3
	36	50	0,57	**45,4±1,6**
Hydantoin	54	50	0,5	**45,6±1,7**
Ureidoessigsäure	36	50	0,42	**40,9±1,3**
Dicyandiamidin	36	50	0,49	33,0±1,3
Ureidoacetat d. Dicyandiamin	18	50	0,23	28,3±2,8
	18	100	0,45	**25,4±4,1**
Biuret	36	50	0,48	38,2±1,9
Tetramethyl-Methylen-Harnstoff	36	50	0,26	**27,8±1,5**
	18	100	0,53	32,8±3,8
	18	200	1,06	37,2±2,7
Triaceton-Diharnstoff	36	50	0,21	35,3±2,0
Malonamid	54	50	0,49	**43,0±1,0**

Beim Harnstoff wurde ein sicherer diuretischer Effekt je nach der benutzten Tierart erst nach der Zufuhr von 100 bzw. 200 mg/100 g erzielt. Es zeigte sich also auch im Tierversuch, daß nur große Mengen ähnlich wie beim Menschen in der Lage sind, die Harnausscheidung zu fördern. Nach einer einmaligen Stoßbelastung bleibt dabei die Größe der Ausscheidungsförderung nur in relativ niedrigen Grenzen. Diese Tatsache spielt aber bei der klinischen Anwendung des Harnstoffs, bei der eine häufige Zufuhr zur Erzielung einer möglichst anhaltenden und gleichmäßigen Beschleunigung der Flüssigkeitsausscheidung erstrebt wird, keine entscheidende Rolle.

Auch bei den anderen geprüften Harnstoffderivaten bleibt die Zunahme der Flüssigkeitsabgabe bei einer einmaligen Stoßbelastung der Tiere auf geringe Ausmaße beschränkt. Eine Reihe der untersuchten

Tabelle 2b. *Diureseversuche an Kaninchen.*

Substanz	Zahl der Versuche	Dosis in mg/100 g	1000/mol	Harnmengen in ccm/kg	Gewichtsabnahme in g	Harnsediment	Klinischer Befund
Harnstoff	12	100	1,66	**313,3±11,8**	**63±14,7**	o. B.	o. B.
	12	200	3,33	**337,4± 6,6**	**120±13,7**	o. B.	1 × Freß-unlust
Dimethylharnstoff	12	12,5	0,14	218,9±13,1	82±16,8	o. B.	o. B.
	12	25	0,28	**340,0±14,3**	**120±20,9**	o. B.	o. B.
	12	50	0,57	**342,8±14,0**	**99±14,5**	o. B.	o. B.
	16	100	1,14	**325,1±19,4**	77±10,9	o. B.	o. B.
Di(p-oxyäthyl)-Harnstoff	10	12,5	0,09	**347,4±11,7**	**134±23,1**	o. B.	o. B.
	10	25	0,17	**335,7±15,0**	**122±22,2**	o. B.	o. B.
Hydantoin	16	25	0,25	288,4±19,1	**106±21,9**	mehr. Leukoz. einz. Erythroz.	2 × Freß-unlust
l-Methyl-Hydantoin	8	25	0,22	**335,0±11,4**	**115±16,9**	o. B.	o. B.
	8	50	0,43	**361,7±10,9**	**172±24,2**	ganz vereinz. Leukoz.	o. B.
Ureidoessigsäure	16	12,5	0,12	313,1±14,5	**104±17,9**	einz. Leukoz.	o. B.
	15	25	0,21	**323,3±11,1**	**123±14,3**	mehr. Leukoz.	o. B.
Biuret	13	12,5	0,12	319,2±12,8	119±20,4	mehr. Leukoz. und Erythroz.	o. B.
	13	25	0,24	**332,2±11,9**	**121±16,3**	viele Leukoz. mehr. Erythroz.	3 × Freß-unlust 2 × Harnentleerungsstgn.
Tetramethyl-Methylen-Harnstoff	7	50	0,26	311,2±18,0	**133±26,5**	reichl. Erythroz. und Leukoz.	3 × Freß-unlust
	4	200	1,06	**115,4± 7,4**	96±17,0	Harn stark blutig	stets Freß-unlust
Triaceton-Diharnstoff	12	25	0,11	319,3±12,9	**122±20,6**	viele Leukoz. und Erythroz.	o. B.
Malondiamid	8	25	0,25	304,6±22,7	64±14,0	reichl. Leukoz. einz. Erythroz.	o. B.

Substanzen unterscheidet sich aber insofern vom Harnstoff, daß bei ihnen ein etwa gleich starker diuretischer Effekt bereits nach der Zufuhr geringer Dosen eintritt.

In dieser Weise zeigte sich ein verstärkter Einfluß auf die Harnabsonderung beim Dimethylharnstoff, indem bereits 25—50 mg/100 g dieser Substanz eine sichere Förderung der Diurese erzielten, während beim Harnstoff die etwa dreifache Menge zur Erreichung eines vermehrten Harnflusses gleich starken Ausmaßes erforderlich war. Auch die mikroskopische Untersuchung des Harnsediments fiel beim Dimethylharnstoff ebenso wie beim Harnstoff selbst günstig aus. Pathologische Beimengungen waren bei keinem Tier im Harn nachweisbar.

Ebenso war für den Di-(p-oxyäthyl)-Harnstoff eine verstärkte Wirksamkeit auf die Harnausscheidung festzustellen. Schon 12,5 mg/100 g dieser Substanz führten etwa zu einem gleich starken diuretischen Effekt wie er mit 200 mg/100 g Harnstoff erreicht wurde. Bei einer Steigerung der Dosis auf 25 mg/100 g blieb der harnfördernde Einfluß in gleicher Stärke bestehen. In Mol berechnet sind das etwa $^1/_{20}$—$^1/_{40}$ der Harnstoffmengen. Dabei waren auch bei der Verwendung dieses Harnstoffderivates an keinem der Tiere im Harnsediment pathologische Ausscheidungsprodukte zu beobachten. Es ist demnach auch durch diese Abwandlung der chemischen Konstitution eine deutliche Hebung der Wassergabe zu erzielen.

Auch mit Hydantoin war im Rattenversuch nach der Zufuhr von 50 mg/100 g ein sicherer diuretischer Effekt auszulösen, dessen Ausmaß aber relativ gering blieb, bei der statistischen Auswertung jedoch noch eindeutig über der Norm lag. Im Kaninchenversuch konnten infolge der relativ schwachen Löslichkeit dieser Verbindung nur Gaben von 25 mg/100 g verabreicht werden. Bei dieser Dosierung hielten sich die ausgeschiedenen Harnmengen innerhalb der normalen Schwankungsbreite. Außerdem fanden sich im Harnsediment schon bei diesen kleinen Gaben mehrere Leukozyten und einzelne Erythrozyten. Zwei der Tiere zeigten dazu starke Freßunlust. Es dürfte daher dem Hydantoin als Diuretikum keine Bedeutung zuzumessen sein.

Günstiger lagen die Verhältnisse dagegen beim 1-Methyl-Hydantoin, das bei der Prüfung am Kaninchen in Dosen von 12,5 mg und 25 mg/100 g eine sichere Steigerung der Diurese hervorrief. Das sind etwa $^1/_7$—$^1/_3$ der molaren Harnstoffmenge. Diese Substanz übertrifft demnach den Harnstoff und auch das Hydantoin erheblich an Wirksamkeit. Dieser günstige Einfluß des Methyl-Hydantoin auf die Harnsekretion wird außerdem nicht durch das Auftreten von Reizwirkungen in den abführenden Harnwegen beeinträchtigt. Im Harnsediment kamen jedenfalls nur bei 2 Tieren vereinzelte Leukozyten zur Ausscheidung.

Bei der Ureidoessigsäure war in den Ratten- und Kaninchenversuchen mit Gaben von 50 bzw. 25 mg/100 g eine Steigerung der Harnsekretion zu erzielen, die sich selbst bei der Berechnung nach statistischen Grundsätzen gegenüber dem Leerversuch als einwandfreie Förderung der Harnabsonderung erwies. Im Harnsediment fanden sich aber bereits nach der Zufuhr von 25 mg/100 g bei allen Tieren mehrere Leukozyten vor. Diese Verbindung setzt somit leichte Reizwirkungen in den abführenden Harnwegen.

Beim Dicyandiamidin in Form des neutralen Zitratsalzes fehlt dagegen im Rattenversuch jede Beeinflussung der Harnabscheidung. Beim Ureidoacetat des Dicyandiamidins kommt es sogar in einer Dosierung von 100 mg/100 g zu einer starken Hemmung der Diurese. Es wurde daher auf die Durchführung von Kaninchenversuchen bei diesen beiden Verbindungen verzichtet, da nach dem Ausfall der Rattenversuche keine Aussicht für einen Einsatz dieser Substanzen als diuresefördernde Mittel gegeben war.

Auch die Diharnstoffderivate in Form des Biuret und des Triaceton-Diharnstoffes ergaben bei der Prüfung im Rattenversuch keine Beeinflussung der Harnabsonderung. Am Kaninchen bewirkte Biuret in einer Dosierung von 25 mg/100 g dagegen wohl eine Steigerung der Wasserabgabe. Dieser Befund wird aber in seiner Bedeutung abgeschwächt, da im Harnsediment beim Einsatz dieser Gaben viele Leukozyten und Erythrozyten vorhanden waren.

Noch ungünstiger wirkt der Tetramethyl-Methylen-Harnstoff, bei dem die Abschwächung der diuretischen Wirkkraft bis zu einer einwandfreien Hemmung der Diurese geht. Außerdem kommt es bei diesem Harnstoffderivat selbst bei der Zufuhr kleiner Dosen zu einer erheblichen Ausscheidung von Erythrozyten und Leukozyten im Harn. Nach hohen Gaben war der Harn sogar bei allen Tieren stark blutig verfärbt. Außerdem zeigten die Tiere Freßunlust. Sie ließen die Rüben fast alle unberührt oder sie fraßen im Verlauf des 24stündigen Aufenthaltes im Diuresekäfig nur ganz kleine Rübenmengen. Auch in den folgenden Tagen hielt die Ausscheidung von roten Blutkörperchen im Harn an. Die Tiere zeigten klinisch einen schlechten Allgemeinzustand, von dem sie sich erst allmählich erholten. Der Tetramethyl-Methylen-Harnstoff bewirkt somit eine erhebliche Beeinflussung des Gesundheitszustandes der Tiere und kommt schon aus diesem Grunde als Diuretikum nicht in Frage. Infolge der Schädigung der Tiere mußten wir nach Abschluß der Versuche die bei der Prüfung dieses Präparates verwendeten 4 Kaninchen ansscheiden. Die Tiere wurden in der Folgezeit nicht mehr benutzt.

Eine ungünstige Wirkung besaß schließlich noch das Malonsäurediamid, nach dessen Zufuhr ebenfalls reichlich Leukozyten und einzelne Erythrozyten dem Harnsediment stets beigefügt waren. Infolgedessen

scheidet auch hier der im Rattenversuch erzielte Anstieg der Harnsekretion nach der Zufuhr von 50 mg/100 g als praktisch bedeutungslos aus.

Vergleicht man insgesamt die Ergebnisse der Ratten- und Kaninchenversuche miteinander, so ergibt sich im allgemeinen eine erstaunlich gute Übereinstimmung in beiden Versuchsreihen. Beide benutzten Tierarten zeigten im wesentlichen bei den gleichen Substanzen entweder eine günstige oder ungünstige Beeinflussung der Harnabsonderung. Hinsichtlich der Dosierung bestanden allerdings gewisse Unterschiede, die aber meistens nicht erheblich sind. Beim Vergleich ist außerdem zu berücksichtigen, daß bei einem Teil der geprüften Substanzen infolge der relativ schlechten Löslichkeit hinsichtlich der Dosierung gewisse Grenzen gesetzt waren, die eine Prüfung über einen größeren Konzentrationsbereich in den Kaninchenversuchen unmöglich machten. Hierdurch erklärt sich zum Teil, daß Substanzen, die im Rattenversuch bei hoher Dosierung noch eine Förderung der Harnsekretion hervorriefen, evtl. im Kaninchenversuch diesen Einfluß auf die Diurese vermissen ließen. Trotz dieser Abweichungen bleibt insgesamt der Eindruck bestehen, daß auch das Kaninchen für die Durchführung von Diureseversuchen unter den gewählten Versuchsbedingungen brauchbar ist. Günstig wirkt sich dabei eine genügend lange Wasserbelastung der Tiere aus, die auch an dieser Tierart eine Prüfung von Substanzen auf ihre Eignung als Diuretikum ermöglicht.

Bei den Kaninchenversuchen finden sich außerdem in der Tabelle 2 in Mittelwerten die während der Diuresedauer eingetretene Gewichtsabnahme in Gramm angeführt. Vergleicht man die erzielten Gewichtsminderungen mit der eintretenden Änderung der Harnsekretion, so ergibt sich selbst hier nahezu gleichartiges Verhalten, indem eine stärkere Abgabe von Flüssigkeit im allgemeinen auch zu einer eindeutigen Abnahme des Körpergewichts führt. Gewisse Abweichungen bestehen allerdings auch hier, die zum Teil bereits durch die Freßlust der Tiere bedingt ist. Insgesamt sprechen aber diese Befunde wohl zugunsten der Auffassung, daß die vermehrte Harnsekretion nach der Zufuhr von Harnstoffderivaten auf einer erhöhten Wassermobilisation der Gewebsdepots beruht und mit echten Wasserverlusten des Körpers verbunden ist.

3. Zeitlicher Ablauf der Diurese nach der Zufuhr von Harnstoff und Harnstoffderivaten.

Die Tabellen 3a und b bringen schließlich noch eine Übersicht über die Verhältnisse im zeitlichen Ablauf der Wasserausscheidung nach der Zufuhr der verschiedenen Harnstoffderivate. Auch hierbei sind die Resultate beider Versuchsreihen nach der Tierart getrennt aufgeführt.

Bei der Mehrzahl der untersuchten Substanzen wird die Förderung der Harnsekretion erst nach Ablauf einer längeren Einwirkungszeit

Tabelle 3 a. *Diureseversuche an Ratten.*

Substanz	Zahl der Versuche	Dosis in mg/100 g	1000/mol	Ausgeschiedene Harnmengen in % d. zugeführten Flüssigkeitsmengen			
				n. 1 Std.	3 Std.	6 Std.	8 Std.
Harnstoff	18	50	0,83	30,0	50,0	70,4	74,0
	18	100	1,66	15,8	56,2	**89,2**	**90,3**
Dimethylharnstoff	36	25	0,28	30,7	56,3	61,1	68,2
	36	50	0,57	40,0	**74,0**	**86,4**	**90,9**
Hydantoin	54	50	0,5	20,4	**72,8**	**89,2**	**91,4**
Ureidoessigsäure	36	50	0,42	**13,5**	60,1	74,8	**81,9**
Dicyandiamidin	36	50	0,49	19,3	47,7	63,8	68,1
Ureidoacetat d. Dicyandiamidin	18	50	0,23	15,5	31,2	52,6	56,1
	18	100	0,45	**0**	**6,2**	**39,1**	**49,1**
Biuret	36	50	0,48	27,2	60,2	70,1	75,2
Tetramethyl-Methylen-Harnstoff	36	50	0,26	**9,3**	**32,9**	50,4	58,4
	18	100	0,53	**5,5**	**32,0**	60,1	67,2
	18	200	1,06	**12,7**	50,4	71,0	74,5
Triaceton-Diharnstoff	36	50	0,21	15,6	60,4	65,4	70,8
Malonamid	54	50	0,49	34,5	65,8	78,1	**86,6**

Tabelle 3b. *Diureseversuche an Kaninchen.*

Substanz	Zahl der Versuche	Dosis in		Ausgeschiedene Harnmengen in % d. zugeführten Flüssigkeitsmengen				Katheterharn
		mg/100 g	1000/mol	n. 3 Std.	6 Std.	9 Std.	24 Std.	
Harnstoff	12	100	1,66	11,3	37,3	57,0	81,7	104,3
	12	200	3,33	10,3	38,0	62,0	**94,3**	**112,3**
Dimethyl-harnstoff	12	12,5	0,14	23,0	44,3	65,3	86,3	106,0
	12	25	0,28	26,0	55,5	65,3	**92,3**	**113,3**
	12	50	0,57	6,3	43,3	66,3	**97,0**	**114,0**
	16	100	1,14	13,3	40,3	52,3	91,7	108,3
Di(p-oxyäthyl)-Harnstoff	10	12,5	0,09	24,0	51,3	**72,7**	**92,0**	**115,7**
	10	25	0,17	28,0	57,7	**78,0**	**91,7**	**111,7**
Hydantoin	12	25	0,25	17,7	36,0	48,0	81,0	99,7
1-Methyl-Hydantoin	8	25	0,22	**31,0**	**63,0**	**69,3**	**98,0**	**111,7**
	8	50	0,43	**37,3**	**69,0**	**80,7**	**112,0**	**120,3**
Ureidoessig-säure	16	12,5	0,12	10,3	29,3	50,7	81,3	104,3
	15	25	0,21	10,0	47,7	55,0	83,3	**108,3**
Biuret	13	12,5	0,12	10,0	28,0	71,7	84,3	106,3
	13	25	0,24	**4,0**	35,0	53,3	83,3	**110,7**
Tetramethyl-Methylen-Harnstoff	7	50	0,26	27,7	65,0	66,7	83,0	103,6
	4	200	1,06	6,3	**18,3**	**23,7**	**36,3**	**51,7**
Triaceton-Diharnstoff	12	25	0,11	10,7	29,7	53,3	78,3	106,3
Malonamid	8	25	0,25	**4,7**	42,3	50,0	65,7	101,3

erreicht. Dadurch kommt es erst nach 6 Stunden bzw. noch später zu einer sicheren Überschreitung der normalen Harnabsonderung. In der Tabelle sind derartige statistisch einwandfreie Zunahmen der Harnausscheidung durch Fettdruck hervorgehoben. In den ersten Stunden bleibt dagegen die Harnabsonderung bei den meisten Substanzen im normalen Schwankungsbereich. Nur bei einzelnen Verbindungen, wie beim Biuret und beim Malonsäurediamid, ist die Harnsekretion im Kaninchenversuch in den ersten Stunden deutlich gehemmt. Das gleiche gilt für die Ureidoessigsäure im Rattenversuch. Erst im weiteren Verlauf wird diese Verzögerung der Harnentleerung wieder wettgemacht und sie geht schließlich sogar in eine Steigerung des Harnflusses über. Beim Ureidoacetat des Dicyandiamidin hält der ungünstige Einfluß auf die Harnabsonderung im Rattenversuch nach höheren Gaben sogar während der ganzen Beobachtungsdauer an. Völlig ungünstig liegen weiterhin die Verhältnisse beim Tetramethyl-Methylen-Harnstoff, bei dem im Rattenversuch anfänglich und im Kaninchenversuch nach der Zufuhr höherer Dosen während der gesamten Versuchsdauer die Harnausschwemmung einwandfrei unter die Norm sinkt.

Abgesehen von diesen Ausnahmen setzt im übrigen bei den diuresefördernden Verbindungen die Steigerung des Harnflusses erst nach Ablauf mehrerer Stunden ein. Eine Ausnahme macht hier nur das l-Methyl-Hydantoin, bei dem bereits in den ersten Stunden nach der Zufuhr per os die Harnsekretion eindeutig gefördert wurde. Auch im weiteren Verlauf liegen die ausgeschiedenen Harnmengen stets sicher über der Norm. Das Methyl-Hydantoin ist somit dem Harnstoff einmal überlegen, weil es bereits in wesentlich kleinerer Dosierung einen gleich hohen diuretischen Effekt hervorruft. Außerdem besitzt es noch den Vorteil, daß bei ihm nahezu jede Reizwirkung auf die abführenden Harnwege entfällt. Schließlich übt es schon nach kürzester Zeit eine Wirkung auf die Wasserabgabe aus. Durch diese rasch eintretende gleichmäßig anhaltende Förderung des Harnflusses übertrifft so das l-Methyl-Hydantoin noch den Dimethyl- und Di(p-oxyäthyl)-Harnstoff, die im übrigen ebenfalls günstige diuretische Effekte aufweisen.

Besprechung der Ergebnisse.

Bei den untersuchten Harnstoffderivaten fanden sich einige Verbindungen, die gemessen am Harnstoff bereits in deutlich niedrigerer Dosis günstige diuretische Effekte erzielten und dadurch dem Harnstoff selbst überlegen waren. Inwieweit diese experimentellen Befunde auf die Verhältnisse am Menschen übertragbar sind, kann nur die Klinik entscheiden. Auch bleibt bei den vorliegenden Befunden unentschieden, ob bei einer mehrfachen Zufuhr die Steigerung der Harnsekretion anhält. Insgesamt dürfte aber bei allen untersuchten Harnstoffderivaten,

auch wenn ihre Wirkungen den Harnstoff übertreffen, die erzielte Zunahme an Wirksamkeit noch nicht ausreichend sein, um der Forderung nach einem geeigneten Harnstoffersatz mit einer wesentlichen Verstärkung der Diurese zu genügen. Die vorliegenden Versuche sind daher nur als erster Ansatzpunkt für die Auffindung diuretisch günstig wirkender Harnstoffabkömmlinge zu werten.

Für die Kenntnis über die Beziehungen zwischen chemischer Beschaffenheit der untersuchten Stoffe und ihre Wirkung auf den lebenden Organismus, speziell auf die Harnabsonderung, lassen sich aus den vorliegenden Untersuchungen etwa folgende Gesichtspunkte ableiten: Der Harnstoff wird als Diamid der Kohlensäure aufgefaßt. Gemäß den mit anderen Säureamiden gemachten Erfahrungen behält die Amidgruppe im allgemeinen eigene charakteristische pharmakologische Eigenschaften. Der Harnstoff stellt aber bekanntlich ein normales Stoffwechselprodukt dar; er wird im Organismus nicht angegriffen und ist nur wenig different; er reagiert praktisch fast neutral. Die physiologische Indifferenz hängt offenbar mit der großen chemischen Beständigkeit zusammen. Seine harntreibende Kraft kommt daher dem Gesamtmolekül zu und beruht vor allem auf seinen physikalisch-chemischen Eigenschaften wie der Änderung der Permeabilität der Zellgrenzflächen, der Quellung und Auflockerung des Gewebes, der Änderung der Dispersität der Eiweißkörper und der Änderung der Oberflächenbeschaffenheit der Zelle[9–12].

Auch die Einführung von Alkylen in eine der beiden Aminogruppen ändert den Wirkungsmechanismus nicht wesentlich. So sind nach SCHNEEGANS und MEHRING[13] Methyl-Äthyl- und Diäthylharnstoff praktisch unwirksam. Kaninchen vertragen 3—4 g ohne irgendwelchen Effekt. Werden dagegen beide Aminogruppen alkyliert, so kommt eine typische Wirkung zum Vorschein. So löst z. B. Triäthylharnstoff bereits in Dosen 2 g/kg beim Kaninchen Krämpfe aus, in denen das Tier innerhalb 24 Stunden zugrunde geht. Entsprechend zu diesen Befunden zeigt auch der NN_4-Dimethyl- und NN_4-Di(p-oxyäthyl)-Harnstoff in den angewandten kleinen Gaben keine schädigende Wirkung auf die Tiere. Ein Unterschied zum Harnstoff besteht aber in der zunehmenden harntreibenden Kraft nach der Alkylierung, indem eine etwa gleich starke Diureseförderung mit deutlich niedrigeren Dosen erzielt wird, und zwar ohne daß irgendwelche Reizwirkungen in den abführenden Harnwegen auftreten. Der Harnstoff veranlaßt sicherlich seine diuretischen Wirkungen zum Teil unmittelbar osmotisch. Dies gilt allerdings mit einer gewissen Einschränkung, da sich nachweisen läßt, daß nach Belastung mit Harnstoff im

[9] BAUER: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **167**, 104 (1932). — [10] HEIM: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **191**, 212 (1939). — Biochem. Z. **291**, 88 (1937). — [11] BECK u. SCHORMÜLLER: Kolloid-Z. **80**, 332 (1932). — [12] WILLIAMS u. WATSON: Nature **1937**, 506. — [13] SCHNEEGANS u. MEHRING: Ther. Mh. **1892**, 325.

allgemeinen der Harnstoffgehalt des Harns stärker ansteigt als die Harnmenge und selbst längere Zeit nach der Rückkehr zu kleinen Harnmengen die Harnstoffausscheidung noch beträchtlich erhöht bleibt. Im Vergleich zum Harnstoff sind bei den alkylierten Harnstoffabkömmlingen die molekularen Konzentrationen, die die Harnförderung bewirken, derart gering, daß hier die Steigerung des Harnflusses kaum von der osmotischen Wirkung abhängig sein kann. Es ist daher bereits auf Grund der vorliegenden Versuche anzunehmen, daß bei diesen Verbindungen andere Faktoren, vielleicht eine direkte Nierenwirkung, die Auslösung der Diurese entscheidend beeinflussen. Durch diese Art der Substitution wird demnach die Qualität der Harnstoffwirkung anscheinend in einem gewissen Umfange verändert. Auch beim l-Methyl-Hydantoin gelten offenbar ähnliche Überlegungen wie bei den alkylierten Harnstoffabkömmlingen, indem auch bei dieser Verbindung nicht die osmotischen Faktoren den Ablauf der Diurese wesentlich beeinflussen, sondern eine eigene charakteristische Wirkungskomponente des Moleküls offenbar in erster Linie für den Eintritt der Diurese verantwortlich ist.

Bei der zweiten Gruppe der untersuchten Substanzen handelt es sich um Ureide. Diese stellen amidartige Abkömmlinge des Harnstoffs mit organischen Säuren dar. Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist die Barbitursäure, ein Kondensationsprodukt aus Malonsäure und Harnstoff. Ähnlich bildet sich bei der Kondensation der Glykolsäure $CH_2OH \cdot COOH$ mit einem Molekülharnstoff Hydantoin unter Austritt von H_2O. Man kann daher dieses als Glykolylharnstoff bezeichnen. Auch beim Hydantoin ist die Kette zu einem Ringsystem geschlossen. Dieser Ring ist im Gegensatz zum Barbitursäurering relativ unbeständig. Auch das Hydantoin gilt als ungiftig. Nach den vorliegenden Versuchen entfaltet es an der Ratte diuretische Wirkungen, und zwar quantitativ etwas stärker als Harnstoff. Im Kaninchenversuch trat jedoch eine leichte Reizung der Harnwege auf, die sich in Form einer geringen Ausscheidung von Leuko- und Erythrozyten bemerkbar macht. Als Diuretikum wird das Hydantoin daher bedeutungslos.

Wie beim Harnstoff steigt die Wirkung mit der Einführung einer Methylgruppe beträchtlich. Charakteristisch ist dabei, daß nicht nur die Harnmenge zunimmt, sondern auch der Eintritt der vermehrten Harnabsonderung beschleunigt wird. Das Methyl-Hydantoin übertrifft somit die alkylierten Harnstoffabkömmlinge wie den Dimethyl- und Di(p-oxyäthyl)-Harnstoff. Außerdem reizt das Methyl-Hydantoin nicht wie das Hydantoin die abführenden Harnwege. Alle diese günstigen Momente dürften vermutlich darauf beruhen, daß diese Verbindung im Organismus nicht entmethyliert wird[14] und so stärkere Effekte ohne jede örtliche Reizwirkung hervorrufen kann.

[14] Gaebler: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **23**, 279 (1927). — J. biol. Chem. (Am.) **67**, 55 (1926); **70**, 763 (1926).

Die Ureidessigsäure (Hydantoinsäure) ist eine Verbindung von Harnstoff mit einem Säurerest. Sie steigert ebenfalls die Harnstoffabsonderung geringgradig; gemessen an der Harnstoffwirksamkeit übertrifft sie diese quantitativ kaum. Einer praktischen Verwendung stellt sich wiederum die vorhandene leicht lokale Reizkomponente auf die Harnwege entgegen. Diese Nebenwirkung ist chemisch verständlich, da die Säureureide sich pharmakodynamisch im allgemeinen ähnlich wie die Säureamide verhalten. Die Reizwirkungen kommen wahrscheinlich dem Molekül selbst zu, da die Hydantoinsäure im Organismus nicht angegriffen werden soll.

Auch das Dicyandiamidin kann man als einen Harnstoffabkömmling vom Typ der Ureide auffassen, und zwar als ein Kondensationsprodukt aus Guanidin (Imidoharnstoff) $HN = C < \begin{matrix} NH_2 \\ NH_2 \end{matrix}$ mit einem Molekül Harnstoff. Man kann es daher als Guanylharnstoff bezeichnen. Man kann es außerdem als Amid der Guanidincarbonsäure $HN = C < \begin{matrix} NH_2 \\ NH \cdot COOH \end{matrix}$ betrachten. Damit ist es ebenfalls als Säureamid charakterisiert. Nach GERGENS und BAUMANN[15] ist es in Form des Hydrochlorids in Dosen bis zu 1 g subcutan verabreicht beim Kaninchen wirkungslos. Nach LÖW[16] wirkt es auch an der Maus bis zu 1 g in Form des Sulfats nicht schädigend. Der Hund verträgt reaktionslos 4—5 g/kg per os innerhalb von 5 Tagen in geteilter Dosis gereicht[17]. Meerschweinchen gehen nach 3,5 g/kg bei fraktionierter Zufuhr über 3 Tage nach einigen Tagen ein. Im Bereiche des Magen-Darmkanals fanden sich bei den gestorbenen Tieren deutliche Ätzwirkungen. In bezug auf die Harnsekretion zeigt das Dicyandiamidin keinen Einfluß. Das Produkt aus Dicyandiamidin und aus Ureidoessigsäure erwies sich dagegen in dieser Beziehung als eine schädigende Substanz mit einer eindeutigen Hemmung der Harnsekretion. Dies dürfte wohl mit der Aufspaltung dieser Verbindung im Organismus und der evtl. daraus resultierenden gegenseitigen Reizförderung ihrer Säureamide in Zusammenhang stehen.

Bei der dritten Gruppe der untersuchten Substanzen handelt es sich um Di-Harnstoffderivate. Ihnen allen kommt gemeinsam mehr oder minder stark ausgeprägt ein ungünstiger Einfluß auf die Harnabscheidung zu. Geringe diuretische Wirkungen besitzt noch das Biuret, das aus 2 Molekülen Harnstoff unter Abgabe von 1 Molekül NH_3 entsteht. Auch das Biuret wird im Organismus nicht angegriffen. Seine Förderung der Diurese geht aber mit einer deutlichen lokalen Reizwirkung auf die Harnwege einher. Hier tritt demnach der Amidcharakter deutlicher als beim Harnstoff in Erscheinung.

Beim Tetramethyl-Methylen-Harnstoff muß man dagegen sicherlich mit einem Abbau im Organismus rechnen, der vermutlich zur

[15] GERGENS u. BAUMANN: Pflügers Arch. **12**, 213 (1876). — [16] LÖW: Chem. Zbl. **1908**, 676. — [17] SUTZER u. SÖLL: Biochem. Z. **25**, 215 (1910).

Abspaltung von Formaldehyd führt und eine genügende Erklärung für die deutlich vorhandenen lokal reizenden Eigenschaften dieser Verbindung abgibt. Ähnliche Überlegungen dürfen auch für den Triacetondiharnstoff gelten. Bekanntlich entfaltet Aceton in höheren Dosen starke örtliche Wirkungen auf die Schleimhäute[18]. Auch für die Kondensationsprodukte des Acetons wie Mesithyloxyd (Kondensationsprodukt aus 2 Mol. Aceton) und Phoron (Kondensationsprodukt aus 3 Mol. Aceton) gelten diese Angaben[19].

Bei der letzten der untersuchten Substanzen handelt es sich um das Diamid der Malonsäure. Diese Verbindung unterscheidet sich von den übrigen dadurch, daß sie kein Harnstoffabkömmling ist. Auch bei ihr sind schwache diuretische Eigenschaften nachweisbar. Diese sind jedoch wiederum gepaart mit lokalreizenden Einflüssen auf die abführenden Harnstoffwege. Die Malonsäure selbst gilt als indifferent. Bei Malonamid bestimmt dagegen sein Charakter als Säureamid den Wirkungstyp und erklärt so das Auftreten der lokalreizenden Wirkungskomponente. Eine Verwendung als Diuretikum kann daher ebenfalls nicht in Frage kommen.

Neben dieser rein chemischen Betrachtung sind für die Beurteilung des Zustandekommens von Wirkungen chemischer Substanzen im Organismus zumeist noch physikalische bzw. physiko-chemische Faktoren von Bedeutung, da diese unter Umständen Transport, Verteilung sowie Resorption, und somit den Eintritt wie die Dauer und die Quantität der Wirkung vielfach zu bestimmen vermögen. Gerade für den Einfluß der Harnstoffderivate auf die Diurese erscheinen derartige Überlegungen besonders wichtig, da ja der eigentliche diuretische Prozeß beim Harnstoff in erster Linie von physiko-chemischen Faktoren abhängig sein soll. Andererseits ist allerdings aus dem verschiedenen Verhalten der einzelnen untersuchten Harnstoffderivate abzuleiten, daß bei den einzelnen Harnstoffabkömmlingen die physikalischen Eigenschaften nicht allein den ganzen Vorgang erschöpfen können, da die Umwandlung der chemischen Konstitution bestimmte Änderungen in der Wirkstärke nach sich zieht. Die chemische Betrachtung bleibt somit zu Recht bestehen, sie erfährt aber durch die Einbeziehung physikalisch-chemischer Faktoren noch eine gewisse Ausweitung und Korrektur.

Es liegt so z. B. durchaus in der Möglichkeit, daß bei den Diharnstoffderivaten bereits die Zunahme der Molekülgröße für die schwächere Wirkung verantwortlich ist. Bei den anderen untersuchten Substanzen werden derartige Momente keine wesentliche Rolle spielen, da die Molekulargewichte sich sämtlich etwa innerhalb der gleichen Größenordnung bewegen. Entscheidend ist bei diesen vermutlich zum Teil die Änderung

[18] Albertoni u. Pisenti: Naunyn-Schmiedebergs Arch. 23, 393 (1887). —
[19] Levin: Naunyn-Schmiedebergs Arch. 56, 346 (1907). —

der Lipoidlöslichkeit. Bekanntlich führt die Einführung hydrophober Gruppen in Form von Methyl- oder Äthylgruppen zu einer erhöhten Lipoidlöslichkeit, die evtl. die Resorption und Ausscheidungsverhältnisse ändert und die erhöhte Wirksamkeit der alkylierten Harnstoffderivate und des 1-Methyl-Hydantoins zum Teil wenigstens erklären kann.

Beim Dicyandiamin ist die mangelnde Wirksamkeit evtl. eine Folge seines lokalreizenden Einflusses, der zum Auftreten von Reizwirkungen im Magen-Darm-Traktus und damit wahrscheinlich zu einer gewissen Ödembildung und Wasserretention im Magen-Darm, evtl. auch zu einer festeren Verankerung im Gewebe Veranlassung gibt. Auf diesen Faktoren beruht unter Umständen bereits das Fehlen des diuretischen Effektes.

Zusammenfassung.

Bei der Prüfung einer Reihe von Harnstoffderivaten hinsichtlich ihres Einflusses auf die Harnabsonderung von Ratten und Kaninchen zeigte sich, daß Dimethyl- und Di(p-oxyäthyl)-Harnstoff den Harnstoff in seiner Wirksamkeit übertreffen. Ebenso besitzt das 1-Methyl-Hydantoin eine stärkere diuretische Wirkung als der Harnstoff. Bei dieser letzteren Verbindung ist außerdem der Wirkungseintritt gegenüber dem Harnstoff wesentlich verkürzt. Bei diesen Verbindungen sind unseres Erachtens vor allem Ansatzpunkte für die weitere Suche nach diuresefördernden Harnstoffabkömmlingen gegeben. Außerdem ließen sich noch für die Ureidoessigsäure, für Hydantoin, Biuret und Malonamid gewisse harntreibende Eigenschaften nachweisen. Bei diesen Verbindungen ist aber die Wirkung auf die Harnabsonderung mit einer Reizung der abführenden Harnwege vergesellschaftet. Diese Verbindungen dürften daher praktisch für eine Verwendung am Menschen nicht in Frage kommen.

Beim Dicyandiamidin und bei Ureidoacetat des Dicyandiamidins sowie bei den Diharnstoffderivaten Tetramethyl-Methylen-Harnstoff und dem Triaceton-Diharnstoff fehlt dagegen jeder diuresefördernde Effekt. Zum Teil bewirken diese Verbindungen sogar eine deutliche Hemmung des Harnflusses.

Es wird außerdem über die aus diesen Versuchen ableitbaren Vorstellungen über die Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und physiologischer Wirkung in dieser Gruppe von organischen Verbindungen berichtet.

Herrn Dr. HAACK von der Chemischen Fabrik von Heyden AG. möchte ich an dieser Stelle für die Herstellung und die freundliche Überlassung der Harnstoffderivate sowie für seine Hilfe bei der Auswahl der untersuchten Substanzen bestens danken.

Nachtrag bei der Korrektur.

(Eingegangen am 26. August 1946.)

In Ergänzung dieser Versuche wurden an der Ratte einige andere Hydantoinabkömmlinge mit gleicher Methodik geprüft. Im Vergleich zum Harnstoff wurden hierbei teilweise mit relativ geringen Dosen gute diuretische Effekte erzielt. Das Formelbild gibt eine Übersicht über die chemische Beschaffenheit der geprüften Substanzen. Es handelt sich um Hydantoinderivate, die durch Einfügung gewisser Alkylgruppen, bzw. Phenoläther in 1- und 5-Stellung gekennzeichnet sind. Außerdem wurde noch ein 5-Phenylhydantoin untersucht.

Die mit diesen Substanzen erzielten diuretischen Wirkungen sind in der Tabelle 4 zusammengefaßt. Die Zunahme der Harnsekretion, ist wiederum nach einer Einwirkungsdauer von 8 Std. in ccm/kg berechnet. Außerdem ist der zeitliche Ablauf der Wasserausscheidung innerhalb dieses Zeitraumes aus der Tabelle ersichtlich.

Tabelle 4. *Diureseversuche an Ratten.*

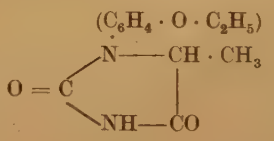
Substanz	Zahl der Versuche	Dosis in mg je 100 g	1000-fach molar	Harnmenge in ccm/kg	Ausgeschiedene Harnmenge in % der zugeführten Flüssigkeitsmengen nach 1 Std.	3 Std.	6 Std.	8 Std.
1-Äthoxyphenyl-	15	20	0,09	20,5	34,9	49,0	63,7	65,0
5-Methyl-Hydantoin	15	40	0,18	**46,9**	49,7	**91,5**	**102,3**	**120,1**
1-Äthoxyphenyl-	15	20	0,08	**42,5**	**67,6**	**84,9**	**97,2**	**106,3**
5-Äthyl-Hydantoin	15	40	0,16	**52,5**	**63,4**	**95,5**	**114,4**	**138,3**
1-Butoxyphenyl-								
5-Methyl-Hydantoin	15	50	0,18	22,8	14,9	33,1	50,7	56,6
5-Phenyl-Hydantoin	15	50	0,28	24,7	10,4	18,9	40,8	60,5
5,5-Methyl-Äthyl-								
Hydantoin	15	50	0,36	36,6	37,4	75,0	79,5	**92,2**

Alle fetten Zahlen bedeuten statistisch einwandfreie Steigerung der Diurese.

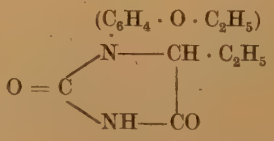
1-Äthoxyphenyl-5-Methyl- bzw. 5-Äthyl-Hydantoin besitzen einen deutlichen Einfluß auf die Förderung der Harnsekretion und zwar in Dosen, die unterhalb der beim Harnstoff notwendigen Mengen liegen. Es genügen etwa $^1/_{10}$ oder beim 1-Äthoxyphenyl-5-Äthyl-Hydantoin sogar nur $^1/_{20}$ der molaren Harnstoffmenge, um eine gleich starke Harnabsonderung zu erzielen. Außerdem ist besonders für die letztere Verbindung charakteristisch, daß die Diurese unmittelbar nach der Zufuhr einsetzt, so daß im Gegensatz zum Harnstoff bereits nach 1 Stunde eine erhebliche Zunahme des Harn-

flusses nachweisbar ist. Die Bedeutung dieser Befunde wird aber dadurch eingeschränkt, daß bei beiden Substanzen die Diurese erst in einem Dosierungsbereich eintritt, bei dem unliebsame Wirkungen kaum vermeidbar sind oder sogar toxische Erscheinungen auftreten. So zeigten beim 1-Äthoxyphenyl-5-Methyl-Hydantoin alle Tiere im diuretisch wirksamen Dosierungsbereich narkotische Erscheinungen in Form von Schläfrigkeit und leichten motorischen Lähmungssymptomen. Bei einem Tier wurde die Seitenlage nahezu erreicht. Dieser Zustand hielt etwa 1 Stunde lang an. Das 1-Äthoxyphenyl-5-Äthyl-Hydantoin löste nach der Gabe von 40 mg/100 g ähnliche Veränderungen in noch stärkerem Ausmaß aus. Bei 3 Tieren trat tiefste Narkose ein, die zum Exitus der Tiere führte. Bei der Zufuhr von 20 mg/100 g machten sich derartige Erscheinungen nicht bemerkbar. Der diuretische Effekt ist auch in diesem Dosierungsbereich deutlich ausgeprägt und erreicht etwa das gleiche Ausmaß wie nach der Anwendung von Harnstoff in optimaler Dosierung. Trotz dieser günstigen Wirkung ist aber zu bedenken, daß bei der Einfügung von Phenoläthern durch die Alkylierung der Phenoleffekt zwar im allgemeinen abgeschwächt wird, daß aber im Organismus das Alkylradikal langsam abgespalten und die Hydroxylgruppe restituiert werden kann. Man muß also damit rechnen, daß evtl. Nebenwirkungen insbesondere bei länger dauernder Anwendung nicht vermeidbar sind. Dies erscheint um so wahrscheinlicher, da diese Verbindungen chemisch mit dem Nirvanol sehr nahe verwandt sind, das ja bekanntlich bei mehrfacher und chronischer Zufuhr häufiger eine Schädigung des Organismus verursacht.

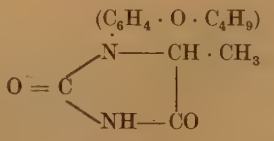
1-p-Äthoxyphenyl-5-Methyl-Hydantoin



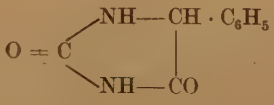
1-p-Äthoxyphenyl-5-Äthyl-Hydantoin



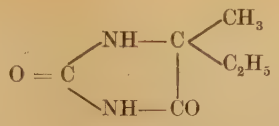
1-p-Butoxyphenyl-5-Methyl-Hydantoin



5-Phenyl-Hydantoin



5,5-Methyl-Äthyl-Hydantoin



Die Einfügung der Butoxyphenylgruppe bedeutet eine Abnahme der diuretischen Wirkkraft. Beim 1-Butoxyphenyl-5-Methyl-Hydantoin werden nicht einmal die Harnmengen im unbelasteten Versuch erreicht. Damit wird auch in dieser Gruppe von Substanzen bestätigt, daß die Zunahme der pharmakologischen Wirkung im allgemeinen nur bis zum Propylrest erfolgt, daß aber häufig mit dem Äthylderivat bereits das Optimum der Wirkung erreicht ist.

Ähnlich fehlt beim 5-Phenyl-Hydantoin, bzw. 5,5-Methyl-Äthyl-Hydantoin ein harnfördernder Effekt. Die Substitution allein in 5-Stellung erscheint somit ungünstig, falls man auf eine Steigerung der Diurese hinzielt.

Insgesamt enthält somit diese Notiz einige ergänzende experimentelle Unterlagen über die Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Wirkung in der Reihe der Harnstoffverwandten.

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. med. H. Elbel).

Über die Verteilung von Thallium bei Vergiftungen.

Von

Dr. phil. habil. Walter Paulus,

Gerichtschemiker am Institut.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 29. Juni 1944.)

Unter den Giften, die in den letzten 15 Jahren am meisten im Vordergrund des Interesses standen, spielt das Thallium eine wichtige Rolle. Eine Fülle von Veröffentlichungen über absichtliche und unabsichtliche Vergiftungen mit Thallium und den daraus hergestellten Präparaten zieht sich durch fast die gesamte medizinische und chemische Literatur. Aus der letzten Zeit seien nur erwähnt die Publikation von Saar sowie das einen guten Überblick gebende Sammelreferat von Hertha Osten. Die medizinische Fragestellung wurde in diesen Arbeiten weitgehend berücksichtigt. Im Rahmen der vorliegenden Veröffentlichung wird daher zunächst auf chemische Fragen eingegangen. Außerdem seien einige Ergebnisse, vor allem hinsichtlich der Verteilung des Thalliums im Organismus, die ein gewisses Interesse finden dürften, angefügt. Denn die Angaben über die Verteilung des Thalliums in den Organen sind in der Literatur trotz der ungeheuren Zahl der Arbeiten nicht übermäßig groß.

Der chemische Nachweis des Thalliums macht im allgemeinen keine großen Schwierigkeiten, zumal wenn es nicht durch andere Elemente, die ähnliche Reaktionen geben, verdeckt wird. Über den qualitativen Nachweis, der durch die spektroskopisch festgestellte grüne Linie bei 5350 A gegeben ist, braucht nichts weiter gesagt zu werden. Für den quantitativen Nachweis stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, und zwar unter anderem gravimetrische, maßanalytische und kolorimetrische. Bei sehr geringen Mengen von Thallium, wie sie meist bei den Fällen, in denen der Tod erst 3—4 Wochen und später nach der Giftaufnahme eintritt, zu erwarten sind, versagen zwangsläufig eine Reihe der obigen Verfahren. Hier eignet sich gut die Bestimmung als Thallojodid an Hand von Vergleichsniederschlägen bekannter Thalliummengen. Als Sammelgefäß werden von verschiedenen Autoren, so auch von Künkele, dickwandige Reagensgläser, die sich nach unten zu verjüngen, empfohlen.

Verfasser fand, daß sich zur quantitativen Bestimmung am besten die Röhrchen, wie sie nach Trommsdorf zur Eiterbestimmung in Milch

Verwendung finden, eignen. Diese sind stabil, was beim Zentrifugieren wichtig ist, haben ein nicht zu kleines Volumen von 10 ccm, verjüngen sich nach unten und gehen allmählich in den eine Graduierung tragenden Unterteil über (Abb. 1). Die zum Nachweis vorbereitete, von Kupfer, Blei und Quecksilber freie Lösung — Salpertersäure muß durch mehrmaliges Abdampfen entfernt werden — wird in das Gefäß gebracht und dazu 5%ige Jodkalilösung gegeben. Nach einiger Zeit sinkt der gelbe Niederschlag von Thallojodid und sammelt sich an der verjüngten Stelle. Durch Drehen und leichtes Klopfen des Glases kann der Niederschlag gut in den verjüngten Teil gebracht werden. Nach 24stündigem Stehen wird dann zentrifugiert. Mit Thalliumlösungen bekannten und abgestuften Gehalts schafft man sich vorher Vergleichsniederschläge die man an Hand der Graduierung mißt. Die Fehlergrenze liegt nach Einarbeitung bei etwa 5—10%.

Abb. 1.

Mit der besprochenen Methode wurden in einigen Fällen von Thalliumvergiftung eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt. Zunächst seien einige Fälle kurz aufgeführt, deren medizinische Seite Saar in der oben zitierten Arbeit publiziert hat. Zwei der Fälle stehen dabei im Vordergrund, da sie — was bei Thalliumvergiftungen sehr selten beobachtet wird — nahezu akut verlaufen sind. In der Familie des Kammerjägers Oe. hatten mehrere Angehörige mit Thallium vergiftete Makronenplätzchen gegessen. Während die Erwachsenen die bei Thalliumvergiftungen üblichen Erscheinungen boten, und zum Teil einige Wochen nach der Giftaufnahme — der genaue Zeitpunkt der Giftaufnahme war wie häufig nicht mit Sicherheit zu ermitteln — verstarben, erkrankten die beiden Kinder von $6^1/_2$ und 10 Jahren unter den Erscheinungen einer Bulbärparalyse und verstarben am 7. bzw. 6. Krankheitstag. Die Menge des aufgenommenen Thalliums war nicht zu eruieren, da einerseits die vom Verfasser untersuchten Makronenplätzchen unterschiedliche Mengen Thallium aufwiesen, andererseits nicht feststand, wie viele Plätzchen im einzelnen gegessen wurden. Die vom Verfasser in den Organen — soweit vorhanden — gefundenen Mengen Thallium sind in der Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1. *mg Thallium je 100 g Organ.*

	Kind Gertr. Oe.	Kind Jack. Oe.	Frau Oe.	Maria Oe.
Leber . . .	0,5	0,43	0,1	Spuren
Niere . . .	0,8	0,77	Spuren	,,
Milz . . .	1,0	1,0	—	,,
Gehirn . . .	0,55	—	0,3	,,
Muskulatur .	0,12	0,42	—	,,
Dickdarm .	0,9	1,65	0,5	0,3
Dünndarm .	1,0	0,95	0,44	0,1

Aus der Tabelle 1 ist zu ersehen, daß das meiste Thallium im Dünndarm und Dickdarm zu erwarten ist. Während im Fall 4 (Maria Oe.) in den

Organen nur noch Spuren Thallium vorhanden waren, konnten daher auch im Dünndarm und Dickdarm noch quantitative Bestimmungen durchgeführt werden. In Leber, Niere und Milz sind des weiteren größere Mengen Thallium vorhanden, worauf auch KÜNKELE schon hingewiesen hat. Auch im Gehirn waren noch deutliche Mengen nachweisbar.

Neben diesen zum Teil nahezu akut verlaufenen Thalliumfällen sei im folgenden ein Vergiftungsfall kurz beschrieben, der akut ablief. Mehrere junge Leute aßen in Unkenntnis der Gefährlichkeit vergifteten roten Weizen. Während einer von ihnen (der 23jährige K.) größere Mengen zu sich genommen haben soll, gaben die übrigen an, nur eine Handvoll gegessen zu haben. K. erkrankte am Tage danach mit Durchfall und Erbrechen und verstarb am 2. Tage nach der Giftaufnahme. Die übrigen wiesen krampfartige Bauchschmerzen ohne Durchfall, starke neuritische Schmerzen in den Beinen — bei einem auch in den Händen — auf. Sie boten keinerlei von der normalen Thalliumvergiftung abweichende Besonderheiten.

Tabelle 2.

100 g Organ bzw. Untersuchungsmaterial	Thallium mg
Blut	5,5
Leber	3,4
Niere	4,2
Gehirn	3,1
Knochen	1,8
Dünndarminhalt	70,0
Dickdarminhalt	77,0
Mageninhalt	12,0

Die Obduktion des Verstorbenen K., die Prof. Dr. PANNING durchführte, ergab keine sichere Todesursache. Im Dickdarm fanden sich allerdings rote Giftweizenkörner. Die chemische Untersuchung ergab eindeutig Thallium und quantitativ auch größere Mengen. Diese sind in der Tabelle 2 zusammengestellt.

Aus dem hohen Thalliumgehalt im Magen-, Dünndarm- und Dickdarminhalt geht hervor, daß die Thalliumaufnahme sehr kurze Zeit vor dem Tod erfolgt sein muß. In Leber, Niere, Gehirn und Blut fanden sich ebenfalls reichliche Mengen. Interessant ist auch, daß bereits im Knochen deutliche Mengen Thallium nachweisbar sind.

Bezüglich der Thalliumverteilung ist auch der folgende Fall von Interesse. In der Literatur finden sich Angaben, daß die Plazenta für Thallium durchlässig sei und im fötalen Gewebe Thallium in größeren Mengen nachgewiesen wurde. Es handelt sich dabei um Tierversuche an trächtigen Kaninchen, die J. FREI und M. SCHLECHTER ausführten. Genaue Angaben über gefundene Mengen im fötalen Gewebe machen die Autoren jedoch nicht. Offenbar wurden keine quantitativen Bestimmungen durchgeführt.

In einem Fall, den wir zu untersuchen hatten, konnten wir dies jedoch nicht bestätigen. Ein 14 Jahre altes Mädchen, im 5. Monat schwanger, unterhielt mit dem Mann ihrer Schwester, der auch der Erzeuger des Kindes ist, ein Verhältnis. Von der Schwester wurde ihr eine Abkochung

von Zeliokörnern mit Kaffee gemischt beigebracht. Die Menge des eingegebenen Thalliums sowie der genaue Zeitpunkt der Giftaufnahme waren auch in der Verhandlung, bei der die angeklagte Schwester zum Tode verurteilt wurde, infolge dauernder Widersprüche nicht mit Sicherheit zu ermitteln. Es dürfte sich um die Eingabe eines Abgusses von etwa 30 bis 40 g Zeliokörnern gehandelt haben. Der Tod trat etwa 3 Wochen nach der Giftaufnahme ein. Die Obduktion, die Dr. Zech durchführte, ergab keine sichere Todesursache. Es fanden sich ausgedehnte, offenbar als toxisch anzusehende Blutungen in den Nieren, entzündliche Veränderungen mit Blutungen an der Schleimhaut des Magens und Darms, Blutungen an der Blasenschleimhaut sowie an der Herzaußen- und -innenhaut, ferner Hauteiterungen.

Die chemische Untersuchung ergab das Vorhandensein von Thallium. Während nun in den Organen deutliche Mengen von Thallium sich fanden: in 100 g Leber 0,5 mg, in 100 g Dünndarm + Inhalt 3,9 mg, konnten sowohl in der Plazenta wie im Fötus nur minimalste Spuren Thallium gefunden werden.

Zusammenfassung.

1. Es werden die gefundenen Thalliumwerte einiger Fälle, von denen zwei nahezu akut verliefen, aufgezeigt.

2. Ein akuter Fall einer Thalliumvergiftung wird beschrieben und die dabei gefundenen Thalliummengen angegeben.

3. Im Fötus und in der Placenta einer thalliumvergifteten Schwangeren konnte Thallium nur in minimalsten Spuren nachgewiesen werden, während in Leber und Dünndarm + Inhalt noch reichlich Thallium vorhanden war.

Literatur.

Saar: Slg Vergift.fälle **13**, Lief. 3. — Osten, H.: Slg Vergift.fälle **11**, Lief. 2. — Künkele, F.: Chem. Z. **62**, 5 (1938). — Frey, J. u. M. Schlechter: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **193** (1939).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Empfindliche photometrische Verfahren zur Bestimmung von Hämiglobin und Hämoglobin.

Von

Manfred Kiese.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 6. September 1944.)

A. Bestimmung des Hämiglobins.

Die Bestimmung des Hämiglobins (Methämoglobins) im Blute ist auf verschiedenen Wegen durchgeführt worden. Ein einfaches rohes Verfahren ermittelt durch Verdünnung einer hämiglobinhaltigen Probe die Konzentration, bei der die Bande des Hämiglobins im roten Gebiet im Spektroskop eben noch erkannt werden kann. Genauer aber umständlicher ist das von Hüfner angegebene Verfahren, die Extinktion einer Blutlösung spektrophotometrisch bei zwei geeigneten Wellenlängen zu messen und aus dem Quotienten der Extinktionen den Gehalt des Blutes an Hämiglobin zu errechnen[1]. Eine wesentliche Verbesserung und Vereinfachung der Hämiglobinbestimmung wurde durch Anwendung objektiver photometrischer Verfahren und Einführung einer indirekten Messung des Hämiglobins erreicht. Evelyn[2] und Havemann[3] benutzten die Farbänderung des Hämiglobins beim Überführen in das Cyanid zur Bestimmung des Hämiglobins. Das Hämiglobincyanid hat im Gegensatz zu Hämiglobin in saurer Lösung nur eine sehr geringe spezifische Extinktion im roten Gebiet. Da Hämoglobin nicht mit Cyanid unter Farbänderung reagiert, kann die beim Überführen von Hämiglobin in Hämiglobincyanid eintretende Aufhellung im roten Gebiet zur Bestimmung von Hämiglobin neben Hämoglobin oder Oxyhämoglobin verwandt werden. Dieses Verfahren hat sich in zahlreichen Untersuchungen zur Bestimmung von Hämiglobin im Blute bei erhöhtem Hämiglobingehalt sehr bewährt. Die Bestimmung sehr niedriger Hämiglobinkonzentrationen neben Hämoglobin, wie sie in normalem Blute vorkommen, oder pathologischer Hämiglobinkonzentrationen in sehr kleinen Blutproben, ist mit diesem Verfahren jedoch nur sehr unsicher. Zwar kann die absolute Extinktionsänderung bei der Messung sehr niedriger Hämiglobinkonzentrationen durch Erhöhung der

[1] Vgl. L. Heilmeyer: Medizinische Spektrophotometrie. Jena 1933. — [2] Evelyn, K. E. u. H. T. Malloy: J. Biol. Chem. (Am.) **126**, 655 (1938). — [3] Havemann, R., Jung, F., B. v. Issekutz jun.: Biochem. Z. **301**, 116 (1939).

Konzentration der Blutlösung vergrößert werden, doch wird dann die Proteinkonzentration der Lösung bereits so hoch, daß unspezifische Absorptionsänderungen durch kolloidchemische Einflüsse der Blausäure auf die Proteine störend wirken können.

Eine wesentlich empfindlichere Hämiglobinbestimmung ist möglich durch Überführen des Hämiglobins in eine Verbindung, die erheblich größere Abweichungen in der Extinktion zeigt, und Messung der Extinktionsänderung in den Gebieten der stärksten Abweichung.

Der Vorteil eines empfindlicheren Verfahrens liegt nicht nur in der Möglichkeit, sehr geringe Hämiglobinkonzentrationen im Blute genauer bestimmen zu können, sondern vor allem auch in der Verminderung der zur Untersuchung erforderlichen Blutmenge zur Bestimmung pathologischer Hämiglobinkonzentrationen. In sehr zahlreichen Hämiglobinbestimmungen nach Evelyn mit Havemanns Photometer erwies sich eine Menge von 0,1 ccm Blut für eine Hämiglobinbestimmung als kleinste Menge, die für eine befriedigende Messung erforderlich ist. Das neue Verfahren erlaubt die Hämiglobinbestimmung bei gleicher oder sogar größerer Meßgenauigkeit bereits mit 0,01—0,02 ccm Blut, also Blutmengen, die auch von kleinen Versuchstieren erhalten werden können.

Prinzip des Verfahrens.

Das Hämiglobin wird indirekt bestimmt durch Überführen in Kohlenoxydhämoglobin und Messung der Zunahme der Extinktion bei 546 und

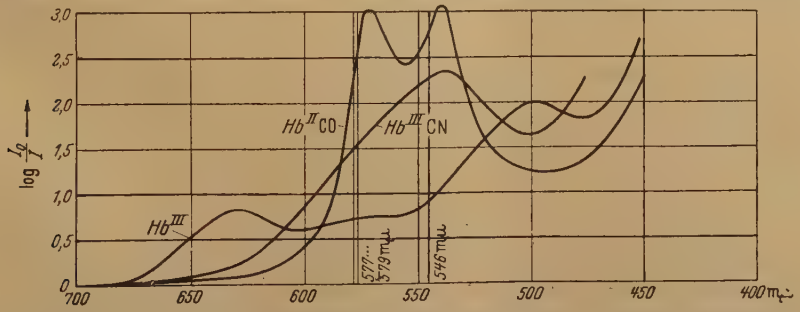


Abb. 1. Extinktion einer Hämiglobin-, Hämiglobincyanid und Kohlenoxydhämoglobinlösung gleicher Konzentration bei p_H 6,6. Die senkrechten Striche bei 546 und 577—579 mμ geben die Lage der entsprechenden Quecksilberlinien an.

577—579 mμ. Die Extinktionsmessung erfolgt mit einem Photozellenphotometer. Als Lichtquelle dient die Emission der Quecksilberlampe bei 546 und 577—579 mμ. Die Grundlagen des Verfahrens sind in Abb. 1 veranschaulicht. Die Messung erfolgt bei den genannten Wellenlängen durch Anwendung der entsprechenden Quecksilberlinien. Aus den Extinktionskurven ist ersichtlich, daß die Extinktionsänderung bei 546 mμ größer ist als bei 577—579 mμ. Daher ist die Messung nur mit der grünen

Quecksilberlinie noch etwa 10% empfindlicher als die mit grüner und gelben Linien. Da bei Anwesenheit einer hohen Konzentration von Kohlenoxydhämoglobin neben dem Hämiglobin eine erhebliche Lichtschwächung eintritt, wird die Anwendung beider Linien vorgezogen, um die Photozellen möglichst stark zu belichten.

In der Abb. 1 ist auch die Extinktion einer Hämiglobincyanidlösung gleicher Konzentration wiedergegeben. Die Zunahme der Extinktion bei 456 und 577—579 mμ durch Überführung des Hämiglobins in Kohlenoxydhämoglobin ist um ein mehrfaches größer als die Abnahme der Extinktion bei 630 mμ durch Überführen des Hämiglobins in Hämiglobincyanid. Dementsprechend ist das neue Verfahren sehr viel empfindlicher als das von EVELYN und HAVEMANN.

Ausführung des Verfahrens.

Die Extinktionsmessungen wurden mit dem Photometer von HAVEMANN[4] durchgeführt, lassen sich jedoch auch mit anderen Photometern durchführen. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberspektrallampe von Osram, die unter Vorschaltung eines Eisen-Wasserstoffwiderstandes (4 Stabilovoltröhren H 85 parallel geschaltet) und einer Drossel mit einem Strom von 0,8 Amp. betrieben wurde. Aus der Emission der Lampe wurden die grünen und die gelben Linien mit Schott-Filtern herausgefiltert, und zwar die grüne und die gelben Linien mit Filter OG 1 und VG 9, die grüne Linie mit Filter OG 1 und VG 9 und BG 20 und die gelben Linien mit Filter OG 2 und VG 3. Extinktionskurven der einzelnen Filter sind in Abb. 7 enthalten. Filter BG 20 war 5 mm, die anderen 1,5 mm stark. Die Messung des Photostroms erfolgte mit einem Galvanometer von Siemens. Hohe Empfindlichkeit des elektrischen Meßgerätes ist erforderlich, wenn die geringen normalen Hämiglobinkonzentrationen neben dem Hämoglobin bestimmt werden, da das als Kohlenoxydverbindung vorliegende Hämoglobin gerade in dem Meßbereich stark absorbiert.

Entsprechend der großen Empfindlichkeit des Verfahrens kann für die Messung auch geringer Konzentrationen des Hämiglobins im Blute die Blutverdünnung sehr stark sein. Bei Blut von normalem Gesamthämoglobingehalt wurden 0,1 ccm in etwa 40 ccm Wasser hämolysiert, nach vollständiger Hämolyse 5 ccm 0,2 mol Phosphat vom p_H 6,8 zugesetzt und auf 50 ccm aufgefüllt. Von Blut mit erhöhtem Hämiglobingehalt genügen 0,03—0,05 ccm oder noch weniger. Nach der Verdünnung des Blutes mit Wasser wurde sofort Kohlenoxyd eingeleitet, um den Sauerstoff zu entfernen und eine Hämiglobinbildung in der verdünnten Lösung zu verhindern. Diente die Lösung der Bestimmung des normalen Hämiglobingehalts, so wurde vor der Messung zentrifugiert, um die Stromata der roten Zellen abzutrennen. Wenn diese auch keine sichtbare Trübung

[4] HAVEMANN, R.: Biochem. Z. **301**, 105 (1939).

der Lösung bedingen, so wird die durch sie verursachte Lichtabsorption doch durch die zur Hämiglobinbestimmung notwendigen Zusätze (Dithionit, Cyanid) verändert und somit die Hämiglobinbestimmung gestört. Dieser Einfluß ist aber so gering, daß bei der Bestimmung erhöhter Hämiglobinkonzentrationen die Entfernung der Stromata unterbleiben kann. Zur Messung wurde die Lösung in 2 Küvetten von 30 mm Schichtstärke gegossen, und diese wurden mit Stopfen verschlossen. Eine der beiden Küvetten diente der eigentlichen Messung, die andere der Justierung des Meßgerätes. Wenn nur sehr kleine Blutmengen zur Verfügung standen wie bei Untersuchungen an Kleintieren, wurde die zur Justierung des Photometers dienende Küvette mit einer anderen Blut- oder Hämoglobinlösung gefüllt. Wir benutzten im allgemeinen eine Küvette mit der zur Hämoglobinbestimmung (s. Abschnitt B) vorgesehenen Blutlösung. Nachdem beide Küvetten verglichen waren, wurde in der zu messenden Lösung das Hämiglobin durch Zusatz von 5—10 mg Natriumdithionit ($Na_2S_2O_4$) reduziert. Das durch Reduktion des Hämiglobins gebildete Hämoglobin reagierte dann mit dem in Lösung befindlichen Kohlenoxyd unter Bildung von Kohlenoxydhämoglobin. Bei den für die Messung zulässigen Verdünnungen reicht die gelöste Kohlenoxydmenge auch aus, wenn ausschließlich Hämiglobin vorliegt. Der Zusatz von Dithionit braucht nicht streng von der genannten Größe zu sein. Da die Lösungen sauerstoffarm sind und unter Luftabschluß gehalten werden, tritt auch bei langem Stehen keine Trübung ein.

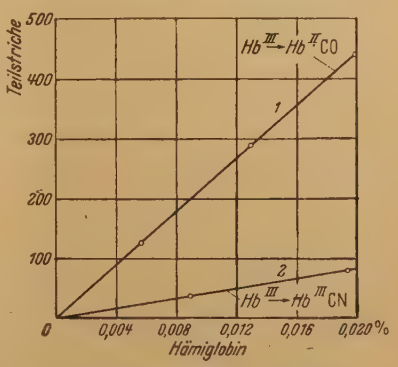


Abb. 2. Abhängigkeit der Photometerteilstriche von der Hämiglobinkonzentration (Eichkurve) bei dem neuen Verfahren zur Hämiglobinbestimmung durch Überführung von Hämiglobin in Kohlenoxydhämoglobin (Kurve 1). Schichtdicke 30 mm, Quecksilberlampe, Filter VG 9 und OG 1 je 1,5 mm. Daneben Eichkurve für die Hämiglobinbestimmung nach Evelyn und Havemann durch Überführen von Hämiglobin in Hämiglobincyanid (Kurve 2).

In Abb. 2 ist eine Eichkurve wiedergegeben, die die Abhängigkeit der am Photometer beobachteten Teilstriche von der Hämiglobinkonzentration zeigt. Die Eichkurve verläuft fast gradlinig. Zum Vergleich ist in Abb. 2 auch eine Eichkurve für die Hämiglobinbestimmung nach Evelyn[2] und Havemann[3] wiedergegeben. Der Unterschied in der Empfindlichkeit der beiden Verfahren ist noch größer als der Unterschied der Extinktionen bei 630 bzw. 546 und 577—579 mμ, da Evelyn und Havemann rotes Licht eines breiten Bereichs, das neue Verfahren aber monochromatisches Licht verwendet. Aus den beiden Eichkurven ist ersichtlich, daß das neue Verfahren die fünffache Empfindlichkeit des von Evelyn und Havemann angegebenen besitzt.

Einer Erörterung bedarf noch die Anwesenheit von Kohlenoxydhämoglobin in verhältnismäßig hoher Konzentration neben dem Hämiglobin bei der Bestimmung geringer Hämiglobinkonzentrationen im Blute. Da gerade zwei monochromatische Lichter benutzt werden von Wellenlängen, die — abgesehen von der SORET-Bande — etwa der stärksten Extinktion des Kohlenoxydhämoglobins im sichtbaren Bereich entsprechen, tritt eine erhebliche Lichtschwächung ein. Dies ist auf das Meßergebnis jedoch nur von geringem Einfluß. In Abb. 3 ist die Abhängigkeit des Meßergebnisses von der Konzentration des Kohlenoxydhämoglobins dargestellt. Die Lichtschwächung beeinträchtigt freilich die Meßgenauigkeit insofern, als die Photoströme dann geringer werden. Durch genügend empfindliche elektrische Messung ist dieser Nachteil aber leicht auszugleichen. Eine Verstärkung der Belichtung der Photozellen ist dadurch möglich, daß die Messung nicht bei weitester Entfernung der Meßphotozelle von der Lichtquelle vorgenommen wird, sondern bei größter Nähe der Photozelle an der Lichtquelle, d. h. die Messung in HAVEMANNs Photometer nicht vom Teilstrich 0, sondern etwa 800 aus vorgenommen wird. Allerdings wird durch die Heranführung an die Lichtquelle die Beziehung zwischen Hämiglobinkonzentration und Teilstrichzahl in dem Sinne verändert, daß einer bestimmten Hämiglobinkonzentration eine kleinere Teilstrichzahl entspricht.

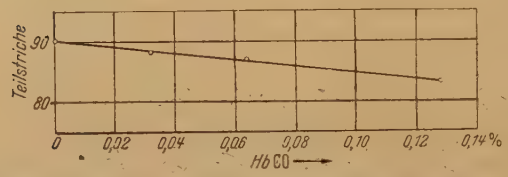


Abb. 3. Einfluß von Kohlenoxydhämoglobin auf die Bestimmung von Hämiglobin durch Überführung des Hämiglobins in Kohlenoxydhämoglobin. Hämiglobinkonzentration 0,006% in 20 mm Schichtdicke. Kohlenoxydhämoglobinlösungen der in der Abszisse angegebenen Konzentration in 10 mm Schichtdicke vorgelegt.

Den geringen Einfluß hoher Kohlenoxydkonzentrationen auf die Messung eliminiert man am einfachsten durch Herstellung einer Eichkurve mit Lösungen, die eine bestimmte Konzentration von Kohlenoxydhämoglobin neben dem Hämiglobin enthalten. Die Konzentration des Kohlenoxydhämoglobins wird so gewählt, daß sie der in den zu untersuchenden Blutlösungen etwa entspricht. Diese Korrektur ist nur für die Bestimmung des normalen Hämiglobingehaltes erforderlich, wo hohe Konzentrationen von Hämoglobin neben sehr niedrigen Konzentrationen von Hämiglobin vorhanden sind.

Die Betriebsspannung der Quecksilberlampe war auf das Meßergebnis von nur sehr geringem Einfluß. So wurden z. B. für eine Hämiglobinlösung bei einer Stromstärke von 0,6 Amp. 449 Teilstriche und bei einer Stromstärke von 1,1 Amp. 446 Teilstriche gemessen. Da die Quecksilberlampe bei Vorschaltung von Drossel und Widerstand (am besten Eisen-Wasserstoffwiderstand) und geringer Stromstärke sehr gleichmäßig brennt, war

die Reproduktion der Messungen auf einen Teilstrich des Photometers ohne Schwierigkeit möglich.

Mit dem Verfahren gelang die reproduzierbare Messung physiologischer Hämiglobinkonzentrationen im Blute bei großer Blutverdünnung, 1:500, also weitgehendem Ausschluß von Störungen durch hohe Proteinkonzentrationen. Die gemessenen Konzentrationen waren bei verschiedenen Tierarten verschieden und bewegten sich zwischen 0 und 0,15 g Hämiglobin in 100 ccm Blut.

Wenn auch die Bedingungen der Messung und die Prüfung aller vermutlichen Fehlerquellen wenig Zweifel daran ließen, daß die in normalem Blute gemessene Zunahme der Extinktion bei 546 und 577—579 mμ durch Hämiglobin bedingt wurde, so war dies noch durch ein anderes optisches Verfahren unter Anwendung der gleichen chemischen Reaktion zu erhärten. Bei der Überführung von Hämiglobin in Kohlenoxydhämoglobin nimmt nicht nur die Extinktion bei 546 und 577—579 mμ zu, sondern die bei 630 mμ nimmt ab wie bei der Überführung des Hämiglobins in Hämiglobincyanid. Entsprechend der geringen Extinktionsänderung mußte für diese Messung allerdings eine konzentriertere Blutlösung verwendet werden.

Über umfangreichere Untersuchungen zur Frage des normalen Hämiglobingehaltes des Blutes wird demnächst eine andere Arbeit unseres Institutes berichten.

B. Bestimmung des Hämoglobins.

Zur Bestimmung des Hämoglobingehaltes des Blutes ist eine Reihe von Methoden in Gebrauch, die in ihrer Empfindlichkeit und Genauigkeit verschieden sind. Sie genügen in sehr vielen Fällen den diesbezüglichen bescheidenen Ansprüchen. So ist die Genauigkeit der Hämoglobinbestimmung nach Sahli, bei der das Hämoglobin einer Blutprobe durch Salzsäure in Hämatin übergeführt und die braune Farbe der sauren Lösung mit einem Standard verglichen wird, für praktische medizinische Zwecke oft ausreichend. Bürker[5] führt den gesamten Blutfarbstoff in freies Hämoglobin über, indem er den Sauerstoff der Lösung mit Dithionit ($Na_2S_2O_4$) reduziert, und vergleicht im Eintauchkolorimeter mit einer Standardlösung. Auf die Fehlerquelle, die in der Bildung von Verdoglobin bei der Behandlung von Hämoglobin mit Dithionit in Gegenwart von Sauerstoff besteht, ist bereits hingewiesen worden[6 7]. Die Kohlenoxydverbindung des Hämoglobins benutzt Palmer[8] zur kolorimetrischen Bestimmung. Stadie[9] und Wu[10] bestimmen den Blutfarbstoff nach Oxydation zu

[5] Bürker, K.: Pflügers Arch. **203**, 274 (1924). — [6] Heubner, W.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **1940**, 352. — [7] Havemann, R.: Klin. Wschr. **1940 I**, 503; **1941 I**, 362. — [8] Palmer, W. W.: J. Biol. Chem. (Am.) **33**, 119 (1918). — [9] Stadie, W. C.: J. Biol. Chem. (Am.) **41**, 273 (1920). — [10] Wu, H.: J. Biochem. (e.; Jap.) **2**, 173 (1922).

Hämiglobin und Zusatz von Cyanid als Hämiglobincyanid kolorimetrisch. HAVEMANN[7] führt alles Hämoglobin in Hämiglobin über und mißt die Extinktion dieser Lösung im roten Gebiet. Neben anderen Farbstoffen sind besonders Trübungen der Lösungen bedenkliche Fehlerquellen bei der direkten kolorimetrischen oder photometrischen Farbstoffbestimmung. Zur Beseitigung von Trübungen machen PALMER[8] und WU[10] die Lösungen mit Ammoniak schwach alkalisch. Um Störungen durch Trübungen und andere Farbstoffe auszuschließen, haben wir in unserem Laboratorium einen indirekten Weg der Hämoglobinbestimmung bevorzugt. Das Hämoglobin wird zu Hämiglobin oxydiert und dies dann indirekt durch Überführung in Hämiglobincyanid (EVELYN und HAVEMANN) bestimmt[11]. Dieses Verfahren ist für sehr viele Zwecke des Laboratoriums ausreichend empfindlich. Alle diese Verfahren bestimmen den gesamten Blutfarbstoff, also Hämoglobin + Hämiglobin. Für bestimmte Fragen interessiert ausschließlich die Konzentration des für den Sauerstofftransport brauchbaren Hämoglobins. Im folgenden wird ein Verfahren zur indirekten Bestimmung des Hämoglobins in Blutproben unter 0,1 ccm beschrieben.

Prinzip des Verfahrens.

Zur indirekten Bestimmung des Hämoglobins wird das Oxyhämoglobin zu Hämiglobin oxydiert und die dabei eintretende starke Verminderung

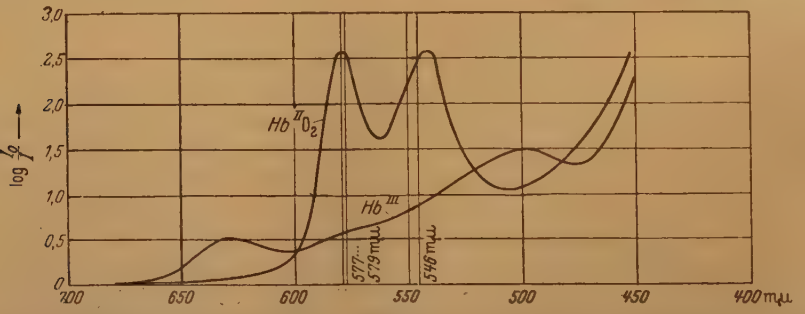


Abb. 4. Extinktion einer Oxyhämoglobin- und Hämiglobinlösung gleicher Konzentration bei p_H 6,6. Die senkrechten Striche geben die bei 546 und 577—579 gelegenen Quecksilberlinien an.

der Extinktion bei 546 und 577—579 mμ gemessen. Die Extinktionsmessung erfolgt unter Verwendung der gelben und grünen Quecksilberlinien. Die Grundlagen der Bestimmung sind in Abb. 4 wiedergegeben. Durch Filter OG 1 und VG 9 wird die rote und blaue Emission der Quecksilberlampe absorbiert.

Ausführung des Verfahrens.

Zur Extinktionsmessung wurde auch bei diesem Verfahren das Photometer von HAVEMANN verwendet. Als Lichtquelle diente eine Queck-

[11] KIESE, M.: Klin. Wschr. **1942 I**, 568.

silberspektrallampe von Osram. Filter zur Isolierung der Quecksilberlinien wie bei der Methode zur Hämiglobinbestimmung. Da die Extinktionsänderungen im Bereich der grünen und gelben Quecksilberlinien noch ähnlicher sind als bei der Hämiglobinbestimmung, wurde fast ausschließlich mit beiden Linien gemessen. 0,01—0,02 ccm Blut werden in etwa 20 ccm hämolysiert, nach der Hämolyse 2,5 ccm Phosphat 0,2 mol/Liter, p_H 6,8 zugesetzt und auf 25 ccm aufgefüllt. Die Flüssigkeitsmenge reichte zur Füllung der Küvette von 20 mm Schichtdicke für das HAVEMANNsche Photometer. Die Messung erfolgte unmittelbar nach dem Auflösen des Blutes, da in den verdünnten Lösungen bei längerem Stehen meßbare Mengen Hämiglobin gebildet werden. Die gefüllte Küvette wurde eingesetzt, die Meßtrommel auf 500 Teilstriche eingestellt, und die Belichtung der Vergleichszelle durch Änderung der Blende so eingestellt, daß zwischen beiden Photozellen kein Strom floß. Dann wurde die Küvette entfernt und mit der Meßzelle kompensiert. Der so an der Meßtrommel erhaltene „Leerwert" diente lediglich der Justierung des Geräts, da nach Oxydation des Hämoglobins zu Hämiglobin eine Überprüfung der Einstellung des Geräts mit der ursprünglichen Lösung nicht mehr möglich ist. Die Justierung des Geräts vor Wiederholung der Messung konnte freilich auch mit einer zweiten Küvette der ursprünglichen Lösung erfolgen, wie es bei der Bestimmung des Hämiglobins beschrieben wurde. Der zu untersuchenden Lösung wurde dann ein Tropfen einer Lösung von 10 g Kaliumferricyanid in 100 ccm zugesetzt und danach die Verminderung der Extinktion gemessen. Durch das Ferricyanid selbst wurde die Extinktion in dem Meßgebiet ein wenig vermindert. Das brauchte nicht weiter berücksichtigt zu werden, da dieser Faktor auch in die Eichkurve mit eingeht. Doch durfte die Ferricyanidmenge nicht von der bei der Herstellung der Eichkurve benutzten abweichen. Die Konzentration der Lösung wurde mit einer Eichkurve aus dem beobachteten Meßtrommelwert errechnet. Abb. 5 gibt eine Eichkurve wieder. Zum Vergleich ist eine Eichkurve für das obenerwähnte Verfahren der Hämoglobinbestimmung als Hämiglobin durch Überführung in Hämiglobincyanid und Messung der Extinktionsänderung im roten Gebiet wiedergegeben. Das neue Verfahren besitzt die 5—8fache Empfindlichkeit dieser Methode.

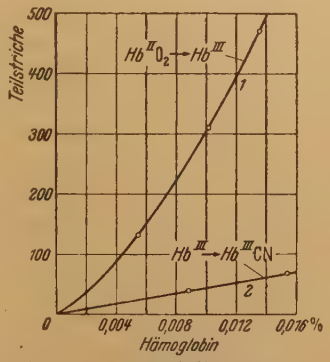


Abb. 5. Abhängigkeit der Teilstrichzahl des Photometers von der Hämoglobinkonzentration (Eichkurve) bei der Hämoglobinbestimmung durch Überführen von Oxyhämoglobin in Hämiglobin (Kurve 1). Schichtdicke 30 mm, Quecksilberlampe, Filter VG 9 und OG 1 je 1,5 mm. Daneben Eichkurve für die Hämoglobinbestimmung nach Oxydation zu Hämiglobin und Bestimmung des Hämiglobins durch Überführen in Hämiglobincyanid nach EVELYN und HAVEMANN (Kurve 2).

Mit dem beschriebenen Verfahren wird nur das Hämoglobin mit zweiwertigem Eisen, nicht das Hämiglobin bestimmt. Im Blute von Organismen, die nicht unter der Wirkung eines hämiglobinbildenden Stoffes stehen, ist das Hämoglobin mit dem Gesamthämoglobin praktisch identisch, da die physiologischen Hämiglobinkonzentrationen unter 1% des Gesamthämoglobins liegen. Wenn Hämiglobin in höherer Konzentration vorhanden oder zu erwarten ist, muß es bei Untersuchungen am Blutfarbstoff bestimmt werden. Die Gesamtfarbstoffkonzentration ergibt sich dann durch Addition.

Das Verfahren kann auch so abgeändert werden, daß nicht Oxyhämoglobin die Ausgangsform des Hämoglobins ist, sondern Kohlenoxydhämoglobin. Dabei wäre die Blutlösung mit Kohlenoxyd zu sättigen. Dieser Weg ist zu wählen, wenn das Blut schon Kohlenoxyd enthält. Da die Extinktionen von Oxyhämoglobin und Kohlenoxydhämoglobin besonders bei 577—579 mμ stark abweichen, kann eine Blutlösung, die einen Teil Kohlenoxydhämoglobin enthält, nicht mit einer für Oxyhämoglobin hergestellten Eichkurve gemessen werden. Allerdings dauert die Oxydation des Kohlenoxydhämoglobins zu Hämiglobin etwas länger als die des Oxyhämoglobins.

Die Sättigung der Blutlösung mit Kohlenoxyd ist auch durchzuführen, wenn die Hämoglobinbestimmung nicht sofort nach der Verdünnung des Blutes erfolgen kann, da sonst in den verdünnten Lösungen Hämiglobin gebildet wird, dessen Auftreten mit dem empfindlichen Verfahren leicht bemerkt werden kann.

Bei der Durchführung der Bestimmung ist die Wasserstoffionenkonzentration konstant zu halten. Die Sauerstoffbindung des Hämoglobins wird durch Wasserstoffionen beeinflußt (Bohr-Effekt). Unter den Versuchsbedingungen ist ein kleiner Teil des Hämoglobins frei und hat daher eine vom Oxyhämoglobin abweichende Extinktion bei den Wellenlängen des zur Messung verwandten Lichtes. Änderungen der Wasserstoffionenkonzentration würden den Anteil an freiem Hämoglobin gegenüber Oxyhämoglobin ändern.

Ohne nennenswerte Einbuße an Genauigkeit kann die erforderliche Menge der zu untersuchenden Lösung noch wesentlich vermindert werden durch Benutzung einer Mikroküvette von 30 mm Schichtdicke und 5 ccm Inhalt. Dann ist die Bestimmung des Hämoglobingehaltes einer Blutprobe von 0,005 ccm mit einem Fehler von 1% möglich.

Neben der größeren Empfindlichkeit bieten die beschriebenen Verfahren zur Bestimmung von Hämiglobin und Hämoglobin noch einige Vorzüge gegenüber früheren in der Genauigkeit der Messung. Bei der Photometrie mit Glühlicht und Filtern, also Extinktionsmessungen in einem breiteren Wellenlängenbereich, liegt in Änderungen der Lichtquelle eine beachtliche Fehlerquelle für die Konzentrationsbestimmungen eines Farbstoffs durch

die Extinktionsmessung und Vergleich mit einer Eichkurve. Dieser Fehler pflegt die Reproduzierbarkeit der Extinktionsmessung zu übersteigen und ist nur durch Anwendung von Testfiltern gering zu halten[12]. Die Verwendung des monochromatischen oder bichromatischen Lichtes der beiden Quecksilberlinien macht diesen Fehler bei den beiden beschriebenen Verfahren sehr klein, so daß hier die Reproduzierbarkeit der Extinktionsmessung die Größe des Fehlers bestimmt. Diese beträgt bei der Verwendung des Photometers von HAVEMANN $\pm$ 0,5—1 Teilstrich.

Zur Eichung aller Verfahren wurde mehrmals umkristallisiertes und dialysiertes Pferdehämoglobin verwendet.

C. Bestimmung des Gesamthämoglobins.

Mit den beiden beschriebenen Verfahren kann entweder Hämiglobin oder Hämoglobin bestimmt werden. In allen Fällen, in denen eine pathologische Vermehrung des Hämiglobins nicht vorhanden ist, wird mit dem einfachen empfindlichen und sehr genauen Verfahren der Hämoglobinbestimmung praktisch das gesamte Hämoglobin erfaßt, da die normalen Hämiglobinkonzentrationen sehr gering sind. Ist die Hämiglobinkonzentration sehr erhöht, so ergibt sich das Gesamthämoglobin aus der Summe Hämiglobin + Hämoglobin. Soll unter diesen Bedingungen das Gesamthämoglobin in einer kleinen Blutprobe durch eine einzige Messung bestimmt werden, so ist dies auf zwei Wegen möglich. Erstens kann das Hämoglobin zu Hämiglobin oxydiert und dann nach dem obenbeschriebenen Verfahren bestimmt werden. Dazu wird zu 100 ccm Blutlösung 1 Tropfen einer 10%igen Lösung von Kaliumferricyanid zugesetzt. Nach 10 Min., wenn die Oxydation des Hämoglobins vollständig ist, wird Kohlenoxyd eingeleitet und die Hämiglobinbestimmung nach dem beschriebenen Verfahren durchgeführt. Durch die Reduktion mit Dithionit wird das überschüssige Ferricyanid entfärbt und dadurch eine ganz geringe Verminderung der Extinktion bei 546 und 577—579 mμ bedingt. Diese kann durch entsprechende Leerwertbestimmungen oder einfacher durch Herstellung der Eichkurve mit Hämoglobin und Durchführung der genannten Operation korrigiert werden.

Zweitens kann der rote Blutfarbstoff in ein Hämochromogen übergeführt und die Extinktion des Hämochromogens gemessen werden. Dieses Verfahren übertrifft das vorige noch an Empfindlichkeit.

Die weitaus empfindlichste photometrische Bestimmung des Gesamtblutfarbstoffs ist möglich durch Bestimmung der Extinktion im Gebiet der violetten SORET-Bande. Für dieses Verfahren sind jedoch Monochromator, violettempfindliche Photozellen und besondere Lichtquellen erforderlich, so daß es hier nicht ausführlicher beschrieben werden soll.

[12] HAVEMANN, R.: Angew. Chemie **54**, 105 (1941).

Prinzip des Verfahrens.

Das Hämoglobin und Hämiglobin werden in ein Hämochromogen übergeführt. Hämochromogene sind durch eine sehr starke spezifische Extinktion zwischen 560 und 570 mμ ausgezeichnet. Ihre Extinktion wird in

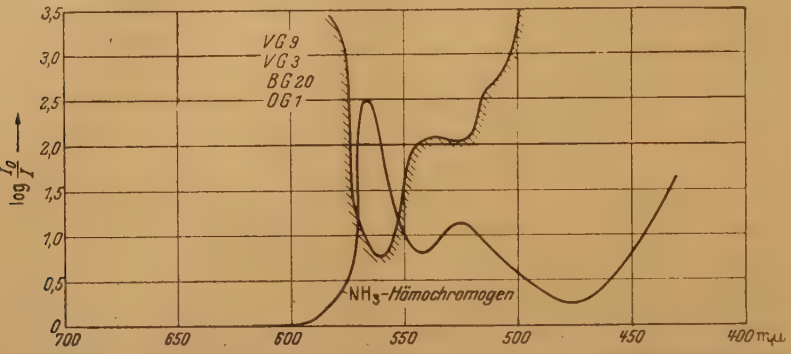


Abb. 6. Extinktion einer Lösung von Ammoniakhämochromogen und der Filterkombination VG 9 und VG 3 und BG 20 und OG 1. Filter BG 20 5 mm, die anderen 1,5 mm stark.

diesem Bereich direkt gemessen. Die stärkste Extinktion im genannten Bereich hat das Pyridinhämochromogen. Wir haben vornehmlich das Ammoniakhämochromogen und Hydrazinhämochromogen verwandt. Die

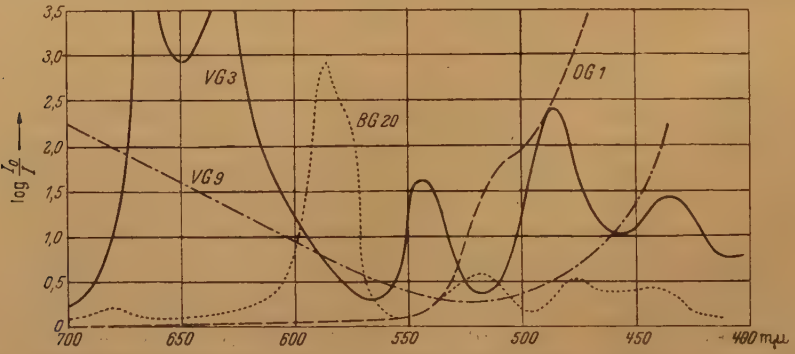


Abb. 7. Extinktionskurven der Filter VG 9 1,5 mm, VG 3 1.5 mm, BG 20 5,0 mm und OG 1 1,5 mm von Schott und Gen.

Extinktionskurve von Ammoniakhämochromogen ist in Abb. 6 wiedergegeben. Da starkes monochromatisches Licht von 560—570 mμ nicht einfach verfügbar ist wie das Quecksilberlicht für 546 und 577—579 mμ, wurde mit Glühlicht und Filtern gemessen. Eine recht empfindliche Messung gelingt bereits durch Anwendung der Filter VG 9 und OG 1, deren Extinktionen in Abb. 7 wiedergegeben sind. Durch weitere Einengung des angewandten Wellenlängenbereichs wird die Empfindlichkeit noch erheblich gesteigert. Das ist möglich durch Zusatz der Filter VG 3 und BG 20,

deren Extinktion ebenfalls in Abb. 7 wiedergegeben ist. Die Extinktion der Filter VG 9 und VG 3 und BG 20 und OG 1 ist in Abb. 6 dargestellt. Die Kombination der Filter hat ihre größte Lichtdurchlässigkeit zwischen 550 und 570 mμ, wo Hämochromogene eine sehr große spezifische Extinktion haben.

Ausführung des Verfahrens.

Als Lichtquelle für die Extinktionsmessungen im Photometer diente eine Glühlampe von 100 Watt, aus deren Licht der Bereich von 550 bis 570 mμ durch die Filter VG 9 1,5 mm, VG 3 1,5 mm, BG 20 5,0 mm und OG 1 1,5 mm isoliert wurde. Durch einen der Lampe vorgelegten Widerstand wurde ihre Emission auf einen bestimmten, nach einem mit gelbem Testfilter OG 2 definierten Wert gehalten.

Zur Herstellung der Hämochromogenlösung wurden 0,01 ccm Blut in 20 ccm Ammoniaklösung mit 20% NH_3 gelöst, mit Dithionit ($Na_2S_2O_4$) reduziert und mit Wasser auf 25 ccm aufgefüllt. Nach 10—20 Min. wurde photometriert. Zunächst wurde für die mit Ammoniaklösung gefüllte Küvette der Leerwert bestimmt, indem sie ins Photometer gesetzt und bei Meßtrommel auf 0 die Vergleichszelle kompensiert wurde. Nach Herausnehmen der Küvette wurde durch Kompensation mit der Meßphotozelle der „Küvettenleerwert" gemessen. Dieser diente der Justierung des Meßgeräts zwischen den Messungen. Anschließend wurde die Küvette mit der Hämochromogenlösung gefüllt und deren Absorption gemessen.

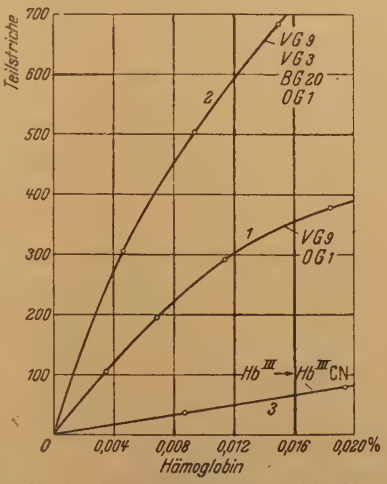


Abb. 8. Abhängigkeit der Teilstrichzahl des Meßgeräts von der Hämoglobinkonzentration (Eichkurve) bei der Bestimmung des Gesamtblutfarbstoffs als Hämochromogen. Kurve 1: Messung mit Filter OG 1 und VG 9. Kurve 2: Messung mit Filter VG 9, VG 3, BG 20 und OG 1. Zum Vergleich in Kurve 3 Eichkurve für die Hämoglobinbestimmung als Hämiglobin durch Überführen in Hämiglobincyanid.

Die Abhängigkeit des Meßtrommelwertes von der Hämochromogenkonzentration ist in Abb. 8 für die Bedingungen unseres Meßgerätes wiedergegeben. Die Beziehungen sind sowohl für die Messung mit den Filtern VG 9 und OG 1 sowie VG 9, VG 3, BG 20 und OG 1 dargestellt. Im letzteren Falle wird die doppelte Empfindlichkeit der Messung nur mit den Filtern VG 9 und OG 1 erreicht. Zum Vergleich ist ferner eine Eichkurve für die Bestimmung des Gesamthämoglobins als Hämiglobin durch Überführung in Hämiglobincyanid hinzugesetzt. Die Bestimmung des Gesamthämoglobins als Hämochromogen besitzt die 15fache Empfindlichkeit jenes Verfahrens.

Oben wurde auf einige wichtige Fehlerquellen bei der Hämoglobinbestimmung durch direkte Kolorimetrie oder Photometrie hingewiesen, nämlich die Störung durch Trübungen und durch andere Farbstoffe. Trübungen kommen bei dem Hämochromogenverfahren nicht vor, sofern dem Blut nicht Stoffe zugesetzt sind, die zufällig in Ammoniak-, Hydrazinhydrat- oder Pyridinlösung unlösliche Verbindungen bilden. Die übrigens auch außerordentlich kleine Blutmenge löst sich unter den Bedingungen der Hämochromogenbildung völlig klar. Störungen durch andere Farbstoffe sind grundsätzlich freilich nicht auszuschließen, doch ist die Größe solcher Fehler auf ein sehr geringes Maß reduziert durch die Verwendung eines Hämoglobinderivats mit einer sehr großen spezifischen Extinktion und durch die Verwendung von Licht eines möglichst engen Wellenlängenbereichs um das Extinktionsmaximum des Farbstoffs.

Wenn man also den Fehler durch andere Farbstoffe in allen Fällen, in denen keine Vermehrung des Verdoglobins vorliegt, vernachlässigen kann, so erreicht die Genauigkeit des Hämochromogenverfahrens doch nicht die der beiden vorigen Methoden. Zunächst ist die Verwendung von Glühlampe und Lichtfilter der einer monochromatischen Emission unterlegen. Die weitgehende Einengung des Wellenlängenbereichs durch eine Mehrzahl von Filtern läßt nur ein Licht verhältnismäßig geringer Intensität übrig. Außerdem sind die Hämochromogene nicht unbeschränkte Zeit beständig. Nicht in Minuten, aber im Laufe von Stunden nimmt die Extinktion der Lösung ab. Es ist daher zweckmäßig, den Zeitraum zwischen Herstellung des Hämochromogens und der Photometrie nicht zu stark zu variieren. Die Lösungen sollen der Luft so wenig wie möglich ausgesetzt werden.

Zusammenfassung.

Es werden vier sehr empfindliche Verfahren zu Bestimmung von Hämiglobin, Hämoglobin und Gesamtblutfarbstoff beschrieben, die die Bestimmung dieser Farbstoffe in 0,05 ccm bis 0,005 ccm Blut ermöglichen.

Die Bestimmung des Hämiglobins erfolgt durch Überführen in Kohlenoxydhämoglobin und Messung der Zunahme der Extinktion bei 546 und 577—579 mμ mit den entsprechenden Quecksilberlinien.

Die Bestimmung des Hämoglobins erfolgt durch Überführen von Oxyhämoglobin in Hämiglobin und Messung der dabei eintretenden Abnahme der Extinktion bei 546 und 577—579 mμ mit den entsprechenden Quecksilberlinien.

Gesamtblutfarbstoff wird nach Oxydation als Hämiglobin mit dem entsprechenden Verfahren oder als Hämochromogen bestimmt durch Messung der Extinktion seiner Lösung bei 550—570 mμ.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg/Lahn.

Änderung von Funktion und Erregbarkeit des Atemzentrums bei elektrischer Vagusreizung.

Von

Fritz Heim.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 16. September 1944.)

Neuere tierexperimentelle und klinische Untersuchungen (Gremels[1], Gremels und Zinnitz[2], Zinnitz[3], Heim[4], Rödiger und Wegemer[5], Heim und Rödiger[6]) haben ergeben, daß bei Reizung des vegetativen Nervensystems der Reizerfolg in quantitativer und qualitativer Hinsicht von der jeweiligen Tonusausgangslage des vegetativen Nervensystems abhängig ist. Dies gilt nicht nur für elektrische Reize, sondern auch für die Wirkung der chemischen Überträgerstoffe des vegetativen Nervensystems für Acetylcholin und Adrenalin und andere auf das vegetative Nervensystem wirkende Pharmaka. Es hat sich ergeben, daß im allgemeinen ein Vagusreiz mittlerer Stärke bei einer nach der vagotonen Seite hin verschobenen Ausgangslage weniger wirksam ist, als bei einem relativen Überwiegen des Sympathikustonus. Doch bei hochgradiger Sympathikotonie nimmt die Wirkungsstärke von Vagusreizen wieder ab, weil ein wesentlicher Teil der zugeführten Reizenergie dazu verbraucht wird, die hochgradige Sympathikotonie zu durchbrechen, so daß nur ein restlicher Teil der Reizenergie für die Erzielung eines effektiven Reizerfolges verbleibt. Bei hochgradiger Vagotonie dagegen kann ein Vagusreiz die scheinbaren Qualitäten eines Sympathikusreizes annehmen, weil er einerseits nicht dazu ausreicht, die bestehende hochgradige Vagotonie noch effektiv zu verstärken, andererseits doch genügt, eine gegenregulatorische Steigerung des Sympathikustonus auszulösen. So kann also abhängig von der jeweiligen vegetativen Tonuslage der Erfolg ein und desselben Reizes nicht nur in quantitativer, sondern auch qualitativer Hinsicht ein recht unterschiedlicher sein. Man wird in diesen Steuerungsvorgängen eine Zweckmäßigkeit erkennen. Der Organismus ist bestrebt, zu starke Abweichungen von der normalen mittleren vegetativen Tonuslage bei Reizungen des vegetativen Nervensystems zu verhindern und bei extremer Tonuslage die Rückkehr zur Mittellage durch Wirkungsumkehr eines Reizes zu erzielen.

Während sich die obengenannten Untersuchungen mit der Abhängigkeit des Reizerfolges vom Tonus des sog. peripheren vegetativen

Nervensystems beschäftigten, soll in der folgenden Arbeit untersucht werden, ob für die vegetativen Zentren die gleichen Beziehungen zwischen Tonus und Erregbarkeit bestehen. Denn es ist anzunehmen, daß der Organismus bestrebt sein wird, auch die vegetativen Zentren in einer mittleren Tonuslage zu halten bzw. bei extremer Reizung sie dahin zurückzuführen, indem mit zunehmendem zentralen Tonus die Ansprechbarkeit der vegetativen Zentren auf erregende Reize abnimmt und hemmenden Reizen gegenüber eine Steigerung erfährt. Es wurde in dieser Arbeit über in den Nervi vagi verlaufende afferente Fasern das Atemzentrum gereizt und unter Registrierung von Atemfrequenz, Atemtiefe und arteriellem Druck die Abhängigkeit des Reizerfolges von dem im Augenblick der Reizung herrschenden jeweiligen Tonus des Atemzentrums festzustellen versucht.

Methodik. Die Versuche wurden an Hunden und Katzen durchgeführt. Als Narkotikum erhielten die Hunde 100 mg Chloralose/kg Körpergewicht, die Katzen 70 mg Chloralose/kg Körpergewicht intramuskulär. Die Wahl des Narkotikums ist bei diesen Versuchen nicht unwesentlich. Es wurde die Chloralose deshalb gewählt, weil schon von GREMELS[7] und neuerdings wieder von THAUER und WEZLER[8] der Nachweis erbracht wurde, daß gerade die Chloralose von allen gebräuchlichen Narkotika die Funktion und Erregbarkeit der vegetativen Zentren der Medulla oblongata am wenigstens in Mitleidenschaft zieht. Die Atemtätigkeit wurde mittels eines Spirometers registriert, das aus zwei durch eine Zwischenwand voneinander getrennten lufthaltigen Kammern bestand. Das Tier atmete in ständigem Wechsel von 30 Sek. aus der einen und anderen Kammer. Während die Kammer, aus der das Tier atmete, nach außen abgeschlossen war, stand die andere zum Austausch mit der Außenluft in Verbindung. Bei den Hundeversuchen entspricht 1 cm des Spirometerausschlages 50 ccm Luft, bei den Katzenversuchen 25 ccm Luft. Der arterielle Druck wurde in der Arteria femoralis mittels eines Quecksilbermanometers registriert. Zur Vagusreizung wurden die beiden Vagi am Hals freigelegt und mit Elektroden versehen. Zur Reizung verwendeten wir Wechselströme, deren Frequenz stets 40 Hertz betrug. Die Spannung im Primärstromkreis war stets 4 Volt. Die Reizintensitäten umfaßten einen Bereich von 0,025 bis 3 mA. Sie konnten an einem Milliamperemeter laufend abgelesen werden. Die Temperatur des Tieres wurde rektal kontrolliert.

Versuche. Es ist bekannt, daß in den Vagi sensible Fasern verlaufen, die einen erregenden und regularisierenden Einfluß auf die Atmung ausüben. Nach W. R. HESS[9] führt die elektrische Reizung der zentralen Vagusstümpfe mit sehr schwachen Reizen zur Beschleunigung der Atmung, während stärkere Reize unter Vertiefung der In- und Exspirationsbewegungen eine Verlangsamung der Atmung und noch stärkere Reize deren Stillstand zur Folge haben. Es ist weiterhin sichergestellt, daß die Reizung afferenter Vagusfasern zur Blutdrucksenkung führen kann, da im Vagus

zentripetale Fasern verlaufen, die auf das Vasomotorenzentrum im depressorischen Sinne wirken. Bei der engen Verknüpfung von Atmung und Kreislauf wird man stets berücksichtigen müssen, daß Änderungen in der Höhe des arteriellen Druckes auch als Folge einer durch eine Änderung der Atemtätigkeit hervorgerufenen Störung der Kohlensäurespannung des Blutes auftreten können. Andererseits vermögen Schwankungen des arteriellen Druckes auch die Atemtätigkeit zu beeinflussen.

Auskunft über den jeweiligen Tonus und die Erregbarkeit des Atemzentrums gibt die Atemtätigkeit selbst. Läßt der Tonus des Atemzentrums

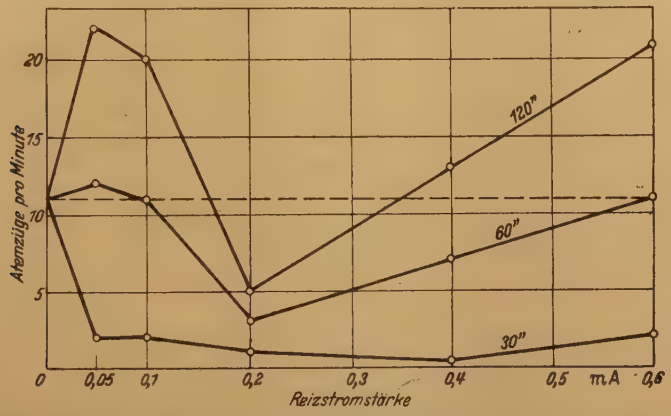


Abb. 1. Hund, 100 mg/kg Chloralose. Reizung des linken Vagus von 2 Min. Dauer. — — — Normale Atemfrequenz. Kurven: Änderung der Atemfrequenz während der ersten 30 Sek., bzw. 60 Sek. bzw. 120 Sek. der Reizung.

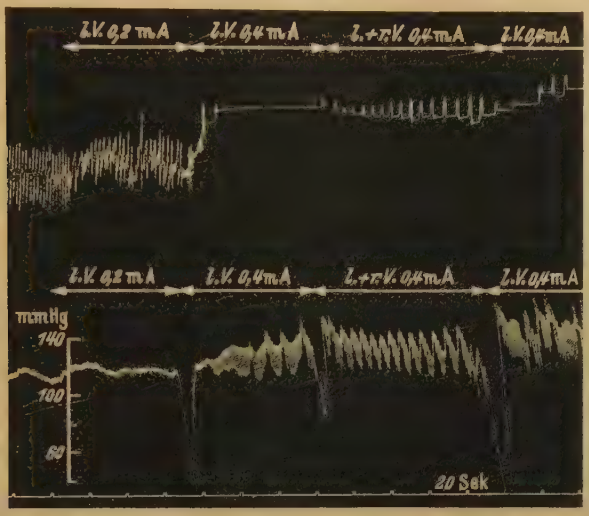
als Folge verminderter Erregbarkeit nach, wird die Atmung langsamer eventuell bis zum endgültigen Atemstillstand, mit steigendem Tonus, d. h. auch mit zunehmender Erregbarkeit nimmt dagegen die Atemfrequenz zu. Auch in mehrstündigen Versuchen zeigen Katzen und Hunde in Chloralosenarkose bei konstant gehaltener Körpertemperatur eine nach Frequenz und Tiefe weitgehend gleichbleibende Atmung. Das bedeutet, daß das Atemzentrum eine konstante Tonusmittellage einnimmt, die z. B. in dem folgenden zu beschreibenden Versuch durch eine mittlere Atemfrequenz von 11 Atemzügen/Min. charakterisiert war. In diesem Versuch wurde der linke Vagus des Tieres mehrmals in größeren zeitlichen Abständen mit Wechselströmen verschiedener Stärke jedesmal 2 Min. lang gereizt. Die Änderungen der Atemfrequenz innerhalb der ersten 30 Sek., 60 Sek. und 120 Sek. der Reizung wurden kurvenmäßig in Abb. 1 zur Darstellung gebracht. Wir ersehen aus der Abbildung, daß während der ersten 30 Sek. der Vagusreizung praktisch unabhängig von der angewandten Reizintensität die Atmung auf 1—2 Atemzüge herabsinkt. Doch schon am Ende der ersten Reizminute entspricht die Atemfrequenz bei den niedrigen

Reizstärken von 0,05 und 0,1 mA und bei den hohen Reizstärken von 0,6 mA fast wieder dem Ausgangswert, und im Verlauf der 2. Min. der Reizung kommt es sogar zu einer weit über die Norm hinausgehenden Beschleunigung.

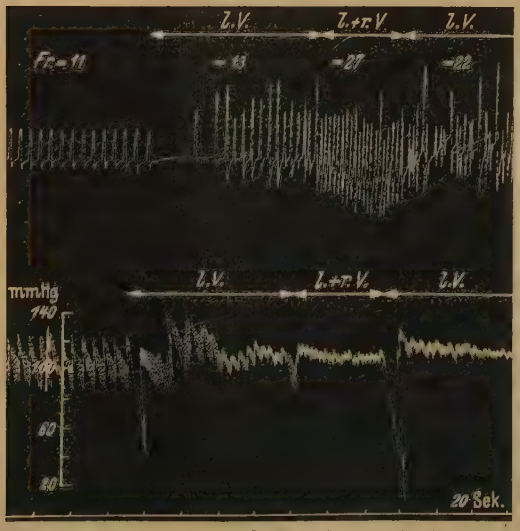
Wir sehen also, daß schon während einer 2 Min. dauernden Reizung die Erregbarkeit des Atemzentrums und somit die Atemtätigkeit sich kontinuierlich verändern können, indem die durch die Reizung anfänglich hervorgerufene Tonusabnahme nicht nur kompensiert wird, sondern bei sehr niedrigen und bei sehr hohen Reizintensitäten in eine über die Norm hinausgehende Funktionssteigerung umschlägt. Die von W. R. Hess[9] angeführte, die Atmung erregende Wirkung sehr schwacher Vagusreize dürfte vielleicht nur sekundärer Natur sein. Durch den primären, das Atemzentrum hemmenden Vagusreiz wird ein gegenregulatorischer Mechanismus im Zentrum selbst ausgelöst, der eine häufig sehr frühzeitig einsetzende Funktionssteigerung hervorruft und so die primäre Hemmungswirkung praktisch vollständig überdecken kann. Die Ursache könnte in der während der anfänglichen hyp- oder apnoischen Phase ansteigenden Kohlensäurespannung im Blut zu suchen sein, die den hemmenden Einfluß des fortbestehenden Vagusreizes durch eine kompensatorische Hyperpnoe auszugleichen bzw. überzukompensieren vermag. Diese Vorstellung mag die bei Anwendung sehr schwacher Reize auftretende kompensatorische Hyperpnoe zu erklären, doch nicht die Tatsache, daß ebenso bei Anwendnng sehr starker Reize der primären Hemmung rasch eine über die Norm gesteigerte Tätigkeit des Atemzentrums folgt, während sie bei mittelstarken Reizen vermißt wird. Man wird doch annehmen müssen, daß gerade bei Anwendung dieser hohen Reizintensitäten in den vegetativen Zentren selbst die Hemmungswirkung kompensierende nervöse Vorgänge ausgelöst und in Wirksamkeit gesetzt werden. Denn jede Kraft erzeugt eine ebenso starke Gegenkraft und es liegt nur in den Besonderheiten des Milieus, ob und in welchem Umfang diese Gegenkraft in Erscheinung zu treten vermag.

In dem zweiten Versuch an einem Hund wurde unter Anwendung stets gleichbleibender Reizintensitäten das Atemzentrum in verschiedenen Phasen der Erregbarkeit gereizt. Änderungen der Funktion und Erregbarkeit erzielten wir durch elektrische Vagusreizungen. Abhängig von der angewandten Reizintensität kann man sowohl eine nach Beendigung der elektrischen Vagusreizung einsetzende, lang anhaltende kompensatorische Hyperpnoe als auch Hypopnoe erzielen. Die Ergebnisse eines derartigen Versuches, bei dem stets die gleiche Reizintensität von 0,4 mA an beiden Vagi zur Anwendung kam, sind in Abb. 2a—c wiedergegeben. Die Abb. 2a zeigt eine Versuchsphase, in der Funktion und Erregbarkeit des Atemzentrums weit über die Norm gesteigert sind, statt der normalen Zahl von 22 beträgt die Atemfrequenz 36 Atemzüge pro Minute. Die Reizung des linken Vagus mit 0,4 mA führt rasch zum

Atemstillstand. Durch die zusätzliche Reizung des rechten Vagus wird die Atemtätigkeit etwas angeregt, doch ist sie noch hochgradig ver-



a



b

Abb 2a u. b. Hund, 6 kg. 100 mg/kg K. G. Chloralose. Oben: Atmung (Inspiration nach oben); unten: arterieller Druck. *l.V.* linker Vagus; *l. + r.V.* linker und rechter Vagus.

langsamt und oberflächlich. Im Gegensatz dazu eine in Abb. 2b wiedergegebene Versuchsphase. Die Atemfrequenz beträgt 11 Atemzüge pro Minute. Der Tonus des Atemzentrums ist also gegenüber der in Abb. 2a

wiedergegebenen Versuchsphase stark herabgesetzt. Die Reizung des linken Vagus mit 0,4 mA führt diesmal nicht zum Atemstillstand, sondern nach einer anfänglichen kurzen Frequenzabnahme zu einer Beschleunigung der Atemtätigkeit von 11 auf 13 Atemzügen pro Minute und nach zusätzlicher Reizung des rechten Vagus sogar auf 27 pro Minute. Dazu hat die Atemtiefe erheblich zugenommen. Betrachten wir noch den Anfangsteil von Abb. 2c, so sehen wir, daß auch hier die Reizung des linken Vagus mit 0,4 mA nach einer nur eben angedeuteten Verlangsamung die Atemfrequenz von 14 auf 30 Atemzüge pro Minute steigert, wobei die Atemtiefe um fast das dreifache zunimmt.

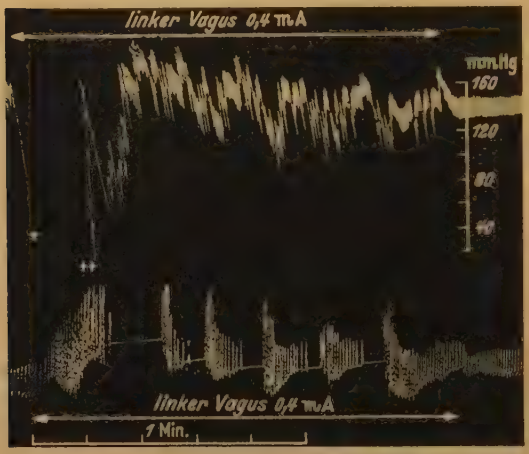


Abb. 2c. Oben arterieller Druck, unten Atmung. Sonst wie 2a. Von + bis + + fehlt die Registrierung des arteriellen Drucks.

Haben die in Abb. 1 mitgeteilten Reizversuche ergeben, daß bei gleichbleibender Tonuslage der Reizerfolg am Atemzentrum in hohem Maße von der Reizintensität abhängig ist, so zeigen uns die in Abb. 2a—c wiedergegebenen Versuchsausschnitte, daß bei Anwendung gleichbleibender Reizintensitäten der Reizerfolg am Atemzentrum in eindeutiger Weise von dem jeweiligen Erregungszustand abhängig ist. Der gleiche Reiz, der bei hohem Tonus das Atemzentrum lähmt, regt es bei niedriger Tonusausgangslage zu beschleunigter und vertiefter Atmung an. Wir haben an Hand der Abb. 1 gesehen, daß sehr schwache Reize von 0,05—0,1 mA nach anfänglicher vorübergehender Hemmung die Atemtätigkeit über die Norm hinaus beschleunigen, und erst stärkere Reize von 0,2—0,4 mA die Tätigkeit des Atemzentrums für länger hemmen. Diese Beobachtung auf den letztbesprochenen Versuch übertragen, würde bedeuten, daß der dort stets angewandte Reiz von 0,4 mA bei verminderter Erregbarkeit des Atemzentrums die Wirkung eines schwachen Reizes zeigt, d. h. erregend wirkt, und bei erhöhter Ansprechbarkeit derselbe Reiz von 0,4 mA die Qualitäten eines stärkeren Reizes bekommt, d. h. im hemmenden Sinne auf den Erregungszustand des Atemzentrums einwirkt. Wenn wir nun den in Abb. 2c wiedergegebenen Versuchsabschnitt weiter betrachten, so sehen wir, daß während der Vagusdauerreizung ein periodischer Wechsel von gesteigerter Atemtätigkeit und kurzen Phasen des Atemstillstandes zustande kommt. Man könnte geneigt

sein, diesen Wechsel als Folge einer mit entsprechender Zu- und Abnahme des Kohlensäurespiegels des Blutes verbundenen periodischen chemischen Reizung des Atemzentrums zu erklären. Doch wird man andererseits zu berücksichtigen haben, daß während der lang dauernden Vagusreizung sich der Tonus des Atemzentrums und somit seine Erregbarkeit mehrfach ändern können und somit der Vagusreiz im mehrfachen Wechsel die Qualitäten eines starken bzw. schwachen Reizes annehmen kann, d. h. abwechselnd erregend und hemmend wirkt.

In den Narkotika und Schlafmitteln besitzen wir Pharmaka, die die Funktion und Erregbarkeit der vegetativen Zentren der Medulla oblongata

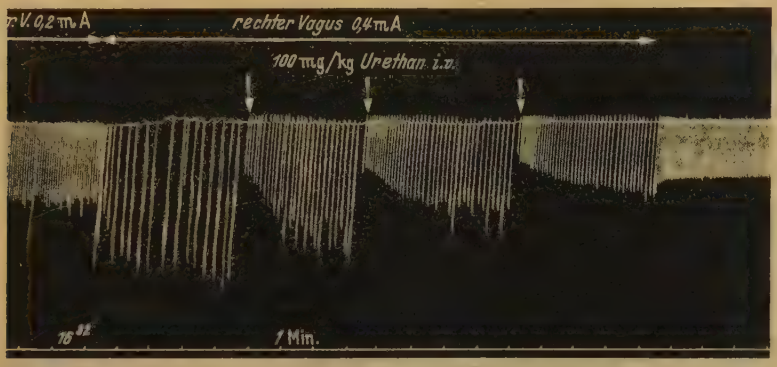


Abb. 3. Katze, 2,5 kg, 70 mg/kg Körpergewicht, Chloralose. Registrierung der Atmung.

zu dämpfen und in hohen Dosen zu lähmen vermögen. Wir haben sie in folgenden Versuchen dazu benutzt, einen weiteren Einblick zu bekommen, in die Beziehungen zwischen Tonus und Erregbarkeit des Atemzentrums. Der folgende Versuch wurde an einer Katze durchgeführt. Es muß hier vorausgeschickt werden, daß bei Reizversuchen an Katzen das Einsetzen gegenregulatorischer Vorgänge kaum zu beobachten ist. Wir haben gesehen, daß selbst bei Vagusdauerreizungen bis zu $^1/_2$ Stunde der Reizerfolg ausschließlich bestimmt wird von der Art und Stärke des angewandten Reizes. Es wurde in dem in Abb. 3 wiedergegebenen Versuch der rechte Vagus bei der Katze 17 Min. lang mit 0,4 mA gereizt. Dieser Dauerreiz bewirkte neben einer starken Verlangsamung der Atmung eine erhebliche Vertiefung. Die Atemfrequenz sank von 18 auf $3^1/_2$ Atemzüge/Min., das Atemvolumen stieg von 35 ccm auf 90 ccm an. 4 Min. nach Beginn der Reizung des rechten Vagus wurden 100 mg Urethan/kg Körpergewicht intravenös gegeben. Wie aus der Abbildung zu ersehen ist, tritt sofort eine wesentliche Beschleunigung und Verkürzung der Atemtiefe ein. Auf eine 2. und 3. Injektion der gleichen Urethanmenge steigt die Atemfrequenz noch weiter an und die Atemtiefe entspricht wieder weitgehend der normalen. Bevor wir auf diesen Versuch näher eingehen, sei ein zweiter

Versuch an einer Katze mitgeteilt, bei dem unter gleichzeitiger Registrierung der Atemtätigkeit und des arteriellen Druckes nach Durchschneiden des Vagus der zentrale Stumpf elektrisch, und zwar mit 0,4 mA gereizt wurde. Wie aus dem Anfangsteil der Abb. 4 hervorgeht, sinkt die Atemfrequenz mit Beginn der Reizung von 17 auf $3^1/_2$ Atemzüge/Min. Auch in diesem Versuch wurde während der Vagusdauerreizung Urethan, und zwar 200 mg/kg Körpergewicht intravenös injiziert. Atemfrequenz und Atemtiefe nehmen auf die Injektion hin sofort normale Werte an. Doch wie im vorigen Versuch ist auch hier die Urethanwirkung nur von begrenzter Dauer und nach etwa 4 Min. kommt die hemmende Wirkung des Vagusreizes wieder zum Durchbruch.

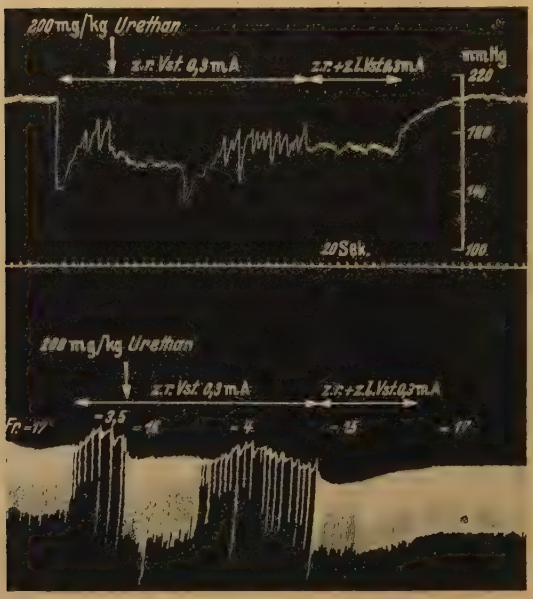


Abb. 4. Katze, 4,1 kg, 70mg/kg Körpergewicht, Chloralose. Oben: arterieller Druck; unten: Atmung. *Fr.* Atemfrequenz/Min.; *z.r.Vst.* zentraler rechter Vagusstumpf; *z.l.Vst.* zentraler linker Vagusstumpf.

Die in den beiden Versuchen gegebenen Urethanmengen liegen weit unter der narkotisch wirksamen Dosis, denn die zur Erreichung einer Vollnarkose bei der Katze notwendige Urethanmenge beträgt 800 bis 1000 mg/kg Körpergewicht. Da selbst narkotisch wirksame Mengen die Atmung nur unwesentlich beeinflussen, muß man annehmen, daß kleinere Urethanmengen in erster Linie die Ansprechbarkeit des Atemzentrums für afferente Reize herabsetzen und die Reizbildung selbst im Atemzentrum weniger stark beeinflussen. Wie wir aus beiden Versuchen ersehen können, wird durch das Urethan die Erregbarkeit des Atemzentrums so weit herabgesetzt, daß die Hemmungswirkung des Vagusreizes an Wirksamkeit stark nachläßt bzw. der Vagusreiz vollkommen wirkungslos bleibt. Diese Tatsache ist sicher folgendermaßen zu erklären. Wie wir sahen, wirken die Reize von 0,3 und 0,4 mA auf das normal erregbare unbeeinflußte Atemzentrum als starke Hemmungsreize. Nachdem durch das Urethan aber die Erregbarkeit des Atemzentrums stark herabgesetzt ist, bekommen diese Reize dem Atemzentrum gegenüber die Eigenschaften schwacher elektrischer Reize, die, wie wir bereits oben sahen, auf das Atemzentrum erregend wirken. Mit dem Abklingen der

Urethanwirkung — Urethan wird intravenös gegeben sehr rasch verseift — nehmen die Vagusreize wieder die Eigenschaften stärkerer Reize an und bewirken deshalb erneut Atemverlangsamung.

Abb. 5. Hund, 8,3 kg, 100 mg/kg Körpergewicht, Chloralose. Registrierung der Atmung (Inspiration nach oben).

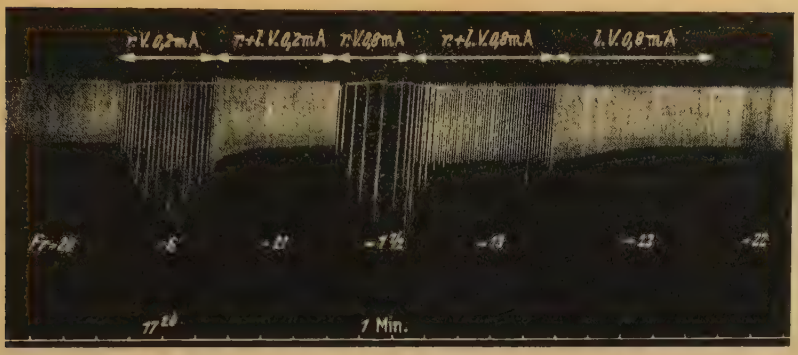
Nachdem wir gesehen haben, daß Narkotika die die Erregbarkeit des Atemzentrums herabsetzen, die Hemmungswirkung von Vagusreizen vorübergehend aufzuheben vermögen, haben wir den Einfluß von zentral

Abb. 6. Hund, 8,3 kg, 100 mg/kg Körpergewicht, Chloralose. Registrierung der Atmung (Inspiration nach oben).

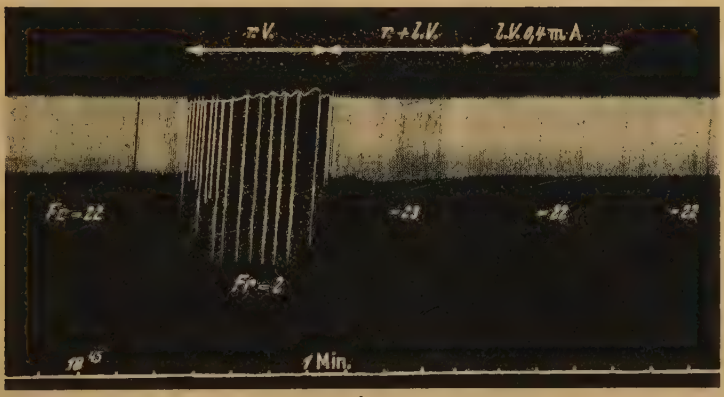
erregenden Mitteln auf das durch Vagusreizung funktionsgehemmte Atemzentrum untersucht. Aus Abb. 5 und 6 ersehen wir, daß die Hemmungswirkung eines 0,3 bzw. 0,4 mA starken Vagusreizes durch 10 mg Cardiazol/kg Körpergewicht sicher unbeeinflußt bleibt und auch 0,2 mg Strychninum nitricum intravenös gegeben, haben kaum einen erregenden Einfluß auf das durch Vagusreizung gelähmte Atemzentrum, während doch Cardiazol und Strychnin in den auch in unseren Versuchen verwandten Konzentrationen eine durch Morphium oder Narkotika herbeigeführte

Lähmung des Atemzentrums fast stets zu durchbrechen vermögen. Man wird sich in letzteren Fällen die Wirkung der genannten Analeptika so vorzustellen haben, daß sie die normale Erregbarkeit des gelähmten Atemzentrums gegenüber den endogenen und exogenen nervösen und chemischen Reizen, die die Atemtätigkeit in normalem Funktionszustand halten, wieder herstellen. Da ihre Wirkung also in einer Erhöhung der Ansprechbarkeit des Atemzentrums afferenten Reizen gegenüber besteht, so wird sich das Atemzentrum unter der Einwirkung dieser Stoffe auch als ansprechbarer den hemmenden Vagusreizen gegenüber erweisen und deshalb wird die funktionshemmende Wirkung von Vagusreizen durch diese Analeptika nicht aufzuheben sein, wie unsere Versuche bestätigen.

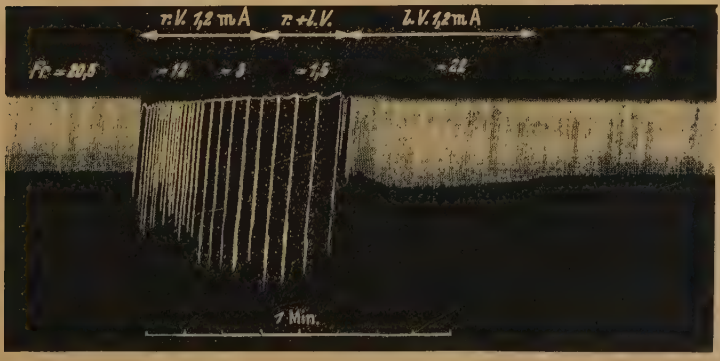
Schließlich sei noch eine Beobachtung angeführt, die die Abhängigkeit des Reizerfolges vom jeweiligen Tonus des Atemzentrums noch einmal deutlich werden läßt. Bei dem in Abb. 4 wiedergegebenen Versuch, der uns weiter oben schon einmal beschäftigt hat, wurden in Vorversuchen die beiden zentralen Vagusstümpfe nacheinander gereizt und dabei festgestellt, daß die Reizung des rechten Vagusstumpfes mit 0,3 mA die Atmung stark verlangsamt, während bei Reizung des linken Vagusstumpfes mit gleicher Stromstärke die Atmung völlig unbeeinflußt blieb. Uns soll an dieser Stelle nicht die Tatsache beschäftigen, daß rechter und linker Vagus recht erhebliche Unterschiede in der Höhe ihrer Reizschwellen aufweisen können. Sie dürften in erster Linie darauf zurückzuführen sein, daß bei der Präparation der Vagi am Hals die die Nerven umgebenden bindegeweblichen Hüllen nicht in jedem Fall auf beiden Seiten gleichmäßig entfernt werden können. An dem in Abb. 4 wiedergegebenen Versuchsausschnitt können wir nun die Beobachtung machen, daß nach vorangegangener Reizung des rechtsseitigen zentralen Vagusstumpfes durch die zusätzliche Reizung des linken Vagus die durch die Reizung des rechten Vagusstumpfes erzeugte Verlangsamung der Atmung fast vollständig aufgehoben wird. Wir sehen also, daß durch die Reizung eines Vagus die Erregbarkeit des Atemzentrums so verändert werden kann, daß bei zusätzlicher Reizung des anderen dieser gegenüber der Norm vollständig veränderte Reizbedingungen vorfindet. In dem in Abb. 4 wiedergegebenen Versuchsbeispiel wird durch die Reizung des linksseitigen zentralen Vagusstumpfes, der am normal erregbaren Atemzentrum völlig wirkungslos blieb, nachdem Funktion und Erregbarkeit des Atemzentrums durch die vorausgehende rechtsseitige Vagusreizung herabgesetzt worden waren, eine stark erregende Wirkung erzielt. Wir wollen uns mit dieser von H. Gremels[10] bei einseitiger und doppelseitiger elektrischer Reizung der Herzvagi bereits beobachteten Erscheinung, die er als Auslöschphänomen bezeichnete, noch an Hand eines weiteren Versuchs etwas eingehender beschäftigen, da unseres Wissens diese Erscheinung in der Literatur jedenfalls für das Atemzentrum noch nicht beschrieben ist.



a



b



c

Abb. 7a—c. Katze, 2,5 kg, 70 mg/kg Körpergewicht, Chloralose. Registrierung der Atmung. *Fr.* Atemfrequenz/Min. *r.V.* rechter Vagus, *l.V.* linker Vagus, *r.+l.V.* rechter und linker Vagus.

Bei dem in Abb. 7a—c wiedergegebenen Versuch haben wir durch Vorversuche einen erheblichen Unterschied in der Reizschwelle des rechten und linken Vagus festgestellt. Während am rechten Vagus durch Reizintensitäten

von 0,1—1,2 mA eine stark hemmende Wirkung auf das Atemzentrum zu erzielen war, ließen bei Reizung des linken Vagus selbst Intensitäten von 1,2 mA die Atmung praktisch unbeeinflußt. In Abb. 7a wurde der rechte Vagus 3 Min. lang mit 0,2 mA gereizt. Die Atemfrequenz sinkt dabei von 20 auf 6, die Atemtiefe steigt von 35 ccm auf 83 an. Durch die zusätzliche Reizung des linken Vagus mit der gleichen Stromstärke wird die hemmende Wirkung des rechten Vagus vollkommen aufgehoben. Atemfrequenz und Atemtiefe nehmen während der doppelseitigen Reizperiode wieder völlig normale Werte an. Nun wurde die Reizstromstärke auf 0,4 mA erhöht. Wie aus der Abb. 7b zu ersehen ist, sinkt die Atemfrequenz von 22 auf 2 Atemzüge/Min., während das Atemvolumen von 35 auf 87 ccm/Atemzug ansteigt. Auch diesmal hebt die zusätzliche Reizung des linken Vagus die depressive Wirkung des rechten Vagus vollkommen auf. Wie aus der Abb. 7b hervorgeht, ist die einseitige Reizung des linken Vagus ohne jeden Einfluß auf Frequenz und Atemtiefe. Steigert man die Reizintensität auf 0,8 mA, so wird, wie nun wieder aus Abb. 7a zu ersehen ist, das Atemzentrum fast vollkommen gelähmt. Reizt man nun zusätzlich auch den linken Vagus mit 0,8 mA, so wird diesmal die Hemmungswirkung des linken Vagusreizes nur teilweise aufgehoben. Steigert man die Reizintensität weiter und reizt, wie das in Abb. 7c geschehen ist, den rechten Vagus mit 1,2 mA, so ist dessen hemmender Einfluß auf das Atemzentrum geringer als der schwächerer Reize. Durch die zusätzliche Reizung des linken Vagus mit 1,2 mA wird diesmal die Hemmungswirkung des rechten Vagus nicht abgeschwächt oder aufgehoben, sondern im Gegenteil noch weiter verstärkt. Die alleinige Reizung des linken Vagus mit 1,2 mA bleibt wieder ohne eindeutige Wirkung auf die Atmung, denn die geringe Beschleunigung und Vertiefung gegenüber der Norm ist als ein gegenregulatorischer Vorgang aufzufassen.

Es konnte am Beispiel zweier Versuche gezeigt werden, daß die Höhe der Reizschwellen des rechten und linken Vagus sehr voneinander abweichen können. In diesen Fällen wird der Reizerfolg desjenigen Vagus, der die niedrigere Reizschwelle besitzt, durch die zusätzliche Reizung des anderen Vagus abhängig von der angewandten Reizstärke häufig ganz oder teilweise aufgehoben. Dieser Auslöscheffekt ist jedenfalls hinsichtlich der Wirkung auf das Atemzentrum sowohl bei Reizung der intakten als auch der zentralen Vagusstümpfe zu beobachten. Er ließe sich vielleicht als Interferenzerscheinung der von beiden Vagi der Medulla oblongata gleichzeitig zufließenden Erregungsimpulse verstehen. Doch läßt sich auf Grund unserer hier mitgeteilten Beobachtungen das Auslöschphänomen auch in anderer Weise erklären. Wir sahen, daß sehr schwache Reize auf das Atemzentrum eine erregende und erst stärkere Reize eine hemmende Wirkung ausüben. Ob ein Reiz aber die Eigenschaften eines sehr schwachen, d. h. erregenden oder die eines stärkeren hemmenden Reizes hat, hängt

nicht so sehr von der absoluten angewandten Reizstärke, sondern viel mehr von dem jeweiligen Erregungszustand des Atemzentrums ab. Wie wir sahen, wirken z. B. bei dem in Abb. 7 a—c wiedergegebenen Versuch Reizintensitäten von 0,1—1,2 mA am rechten Vagus als starke Hemmungsreize auf das Atemzentrum, während die gleichen Reizstärken für den linken Vagus als Hemmungsreize unterschwellig sind. Sie lassen jedoch auch eine eindeutige erregende Wirkung auf das normal erregbare Atemzentrum vermissen. Setzt man aber durch Reizung des rechten Vagus Funktion und Erregbarkeit des Atemzentrums herab, so übt nunmehr die Reizung des linken Vagus einen stark erregenden Einfluß auf das Atemzentrum aus, wie wir annehmen möchten deshalb, weil infolge der verminderten Erregbarkeit des Atemzentrums der am normal erregbaren unwirksam gebliebene linksseitige Vagusreiz nunmehr die erregenden Eigenschaften schwacher Reize bekommt. Werden beide Vagi mit 0,8 mA gereizt, so wird der rechtsseitige Vaguseffekt nur teilweise aufgehoben, und zwar nicht nur, weil durch die Erhöhung der Reizintensität der rechtsseitige Hemmungsreiz an Stärke zunimmt, sondern auch deshalb, weil die nur schwachen Reizen zukommende erregende Eigenschaft durch die Verstärkung der Reizintensität am linken Vagus ebenfalls auf 0,8 mA abnehmen muß. Erhöht man schließlich die Reizstärke auf 1,2 mA, so bleibt das Auslöschphänomen aus. Die Reizabstraktion geht in den Vorgang der Summierung zweier Einzelreize über. Der Grund hierfür ist folgender. Die Reizintensität von 1,2 mA beeinflußt bei Reizung des rechten Vagus nicht mehr ausschließlich das Atemzentrum im hemmenden Sinne, sondern sie löst bereits eine gegenregulatorische Funktions- und Erregbarkeitssteigerung aus. In der Tat sahen wir in Abb. 7, daß der Reiz von 1,2 mA eine geringere hemmende Wirkung ausübte, als der schwächere Reiz von 0,8 mA. Es kommt noch dazu, daß die Reizintensität von 1,2 mA am linken Vagus zu groß ist, als daß ihr noch die erregenden Eigenschaften schwacher Reize zukommen könnte.

Die mitgeteilten Versuche haben ergeben, daß bei elektrischer Reizung der in den Vagi zum Atemzentrum verlaufenden zentripetalen Nervenfasern die Funktion des Atemzentrums unabhängig von der angewandten Reizstärke primär stets im hemmenden Sinne beeinflußt wird. Die Funktions- und Erregbarkeitshemmung kann je nach der angewandten Reizstärke und Reizdauer gefolgt sein von einer kompensatorischen Funktions- und Erregbarkeitssteigerung. Letztere kann entweder als die Folge eines erhöhten Kohlensäurereizes oder aber als Folge der während der Reizung sich verändernden Erregbarkeit des Atemzentrums aufgefaßt werden. Es hat sich weiterhin ergeben, daß bei Anwendung gleicher Reizstärken der Reizerfolg in quantitativer und qualitativer Hinsicht von dem jeweiligen im Augenblick der Reizung herrschenden Tonus des Atemzentrums abhängig ist. Auch das sog. Auslöschphänomen findet darin seine Erklärung.

Urethan hebt in geeigneten Konzentrationen die Hemmungswirkung von Vagusreizen auf das Atemzentrum auf, weil es dessen Erregbarkeit auch für afferente hemmende Vagusreize herabsetzt. Analeptica sind an dem durch Vagusreizung funktionsgehemmten Atemzentrum wirkungslos, weil sie durch ihre die Erregbarkeit nervöser Elemente steigernde Eigenschaft auch die Ansprechbarkeit des Atemzentrums für die hemmenden Vagusreize mit erhöhen. Es hat sich unsere eingangs getroffene Feststellung bestätigt, daß auch die vegetativen Zentren — speziell das Atemzentrum — durch entsprechende Änderung ihrer Erregbarkeit extreme Tonusverschiebungen zu verhindern imstande sind.

Zusammenfassung.

An Hunden und Katzen wurden die intakten Vagi bzw. nach Durchschneidung die zentralen Vagusstümpfe elektrisch mit Wechselströmen verschiedener Intensität bei gleichbleibender Frequenz gereizt und der Reizerfolg auf Atemfrequenz und Atemtiefe beobachtet. Es ergab sich, daß die Wirkung der afferenten Vagusreize in quantitativer und qualitativer Hinsicht neben der angewandten Reizstromstärke von dem jeweiligen im Augenblick der Reizung herrschenden Tonus, d. h. Funktions- und Erregbarkeitszustand des Atemzentrums abhängig ist. Es konnte beobachtet werden, daß die Hemmungswirkung einseitiger Vagusreizung auf das Atemzentrum durch die zusätzliche Reizung des zweiten Vagus teilweise und vollständig aufgehoben werden kann. Es wurde schließlich die Wirkung von Urethan einerseits und Cardiazol und Strychnin andererseits auf das durch Vagusreizung funktionsgehemmte Atemzentrum untersucht.

Literatur.

[1] Gremels, H.: Arch. exper. Path. (D.) **179**, 360 (1935); **188**, 1 (1937). — Erg. Phys. **42** (1939). — Dtsch. Z. Chir. **258**, 184 (1943). — [2] Gremels u. Zinnitz: Arch. exper. Path. (D.) **188**, 79 (1937). — [3] Zinnitz: Arch. exper. Path. (D.) **188**, 328 (1938). — [4] Heim, F.: Arch. exper. Path. (D.) **196**, 51 (1940). — [5] Rödiger u. Wegemer: Z. exper. Med. **108**, 472 (1940). — [6] Heim u. Rödiger: Klin. Wschr. **1946**. — [7] Gremels, H.: Arch. exper. Path. (D.) **162**, 29 (1931). — [8] Thauer u. Wezler: Arch. exper. Path. (D.) **200**, 84 (1942). — [9] Hess, W. R.: Beiträge zur Physiologie des Hirnstamms, Teil 2. Leipzig 1938. — [10] Gremels, H.: Arch. exper. Path. (D.) **179**, 360 (1935).

Aus der Inneren Abteilung des DRK-Augusta-Hospitals Berlin
(Chefarzt: Prof. Dr. med. et phil. R. Enger †).

Nephrin, das blutdrucksteigernde Hormon der Niere.

Von

R. Enger †.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. September 1944.)

Auf Grund umfangreicher statistischer Untersuchungen sind der arterielle Hochdruck und seine Folgezustände als die häufigste Ursache für Arbeitsunfähigkeit, Siechtum und Tod überhaupt anzusehen. Der Frage nach der Entstehung der Hypertonie kommt also eine überaus große praktische Bedeutung zu, zumal ihre Klärung die Aussicht auf neue Wege für die Verhütung und eine ursächliche Behandlung dieser Krankheit eröffnen würde. Aus mannigfaltigen Gründen besitzt diese Frage aber auch ein überragendes theoretisches Interesse, so daß sich die experimentelle Forschung seit Jahrzehnten in ausgedehntem Maße mit ihr befaßt hat.

Klinische Beobachtungen haben schon seit langem die engen Beziehungen zwischen Niere und arteriellem Hochdruck nahegelegt. Vor allem von Volhard wurde auf die überragende Bedeutung des arteriellen Hochdrucks für die Pathogenese und Prognose der Nierenerkrankungen hingewiesen. Es zeigte sich, daß die Hypertonie im Gefolge von Nierenerkrankungen mit einer Störung der Nierendurchblutung auftritt und eine Reihe von Krankheitserscheinungen, insbesondere die Augenhintergrundsveränderungen, legten den Gedanken nahe, daß der renale Hochdruck durch einen im Blute kreisenden, auf den Gefäßapparat wirkenden Stoff bedingt wird.

Ich habe mich deshalb um den experimentellen Beweis für die chemische Natur des renalen Hochdrucks und um die Isolierung eines aus der Niere stammenden, blutdrucksteigernden Hormons bemüht.

Der folgende Bericht stützt sich auf eine experimentelle Arbeit von mehr als $1^1/_2$ Jahrzehnt Dauer und viele Tausende von Einzeluntersuchungen, die von mir und meinen Mitarbeitern durchgeführt wurden.

Wir erbrachten zunächst einen indirekten Beweis für die stoffliche Natur des renalen Hochdrucks: Gemeinsam mit Gerstner löste ich die Niere völlig aus dem Gewebszusammenhang des Organismus unter Durchtrennung von Ureter, Arteria und Vena renalis. Durch Kanülen in diesen Gefäßen stand die Niere mit dem übrigen Körper nur noch in humoralem

Austausch. Da auch in dieser Versuchsanordnung von der Niere eine Blutdrucksteigerung ausgelöst wurde, konnte diese nur durch einen aus der Niere in den Blutkreislauf gelangten Stoff hervorgerufen sein.

Gemeinsam mit Linder und Sarre untersuchte ich die Abhängigkeit der Blutdrucksteigerung von der Nierendurchblutung in Versuchen mit der Reinschen Stromuhr.

Es kommt nach Herabsetzung der Nierendurchblutung auf etwa 10% des Ausgangswertes zu einer anhaltenden Blutdrucksteigerung von über 40 mm Hg. Ferner zeigte sich, daß auch schon nach einer relativ geringfügigen Drosselung der Nierendurchblutung auf etwa 80% des Ausgangswertes der Blutdruck, der vorher 2 Stunden völlig konstant war, ansteigt. Die Durchblutung stellt sich bei gleichbleibender Drosselstellung mehrmals praktisch völlig wieder her. Im ersten Teil des Versuches fällt diese Erscheinung mit dem Anstieg des Blutdrucks zusammen, so daß dieser zur Erklärung der Mehrdurchblutung herangezogen werden kann. Da im weiteren Verlauf des Versuches die Wiederherstellung der Durchblutung auch bei konstant bleibendem Blutdruck auftritt, ist sie in dieser Phase wohl durch eine Verminderung des peripheren Widerstandes in der Strombahn der Niere bedingt.

Gemeinsam mit Linder und Sarre ging ich auch der Frage nach, wieweit der Hypophyse und der Nebenniere eine entscheidende Bedeutung für die Entstehung des renalen Hochdrucks zukommt. Wir drosselten die Nierendurchblutung bei nebennieren- und hypophysenlosen Hunden und konnten danach auch in dieser Versuchsanordnung einen deutlichen Blutdruckanstieg beobachten. Nebenniere und Hypophyse können also keine ausschlaggebende Rolle für die Pathogenese des renalen Hochdrucks spielen. Auffallenderweise wurde keine deutliche Blutdrucksteigerung nach Drosselung der Nierendurchblutung an dekapitierten Tieren gefunden. Auf die Bedeutung dieser Beobachtung wird später noch einzugehen sein.

Nach den angeführten Untersuchungen war anzunehmen, daß ein aus der Niere stammender Stoff durch seine Wirkungen auf den Kreislaufapparat den renalen Hochdruck erzeugt. Es lag nahe, zu untersuchen, ob das von Tigerstedt und Bergmann 1898 in der Kaninchenniere gefundene Renin mit diesem Stoff identisch ist. Das Renin ist alkoholunlöslich und nicht dialysierbar, also offenbar eine hochmolekulare Substanz. Trotz zahlreicher darauf gerichteter Untersuchungen konnte es niemals im Blute beim renalen Hochdruck direkt nachgewiesen werden. Taggart und Drury zeigten dagegen an der Wirkung des Renins auf den experimentellen renalen Hochdruck, daß das Renin nicht für die Entstehung der renalen Hypertonie unmittelbar verantwortlich gemacht werden kann.

Bei dieser Sachlage schien es mir notwendig, in der Niere nach anderen blutdrucksteigernden Stoffen zu suchen. Und zwar richteten wir unser

Augenmerk besonders auf alkohollösliche, dialysierbare, also offenbar niedermolekulare Substanzen. Zur Ausschaltung aliphatischer Amine und anderer störender Begleitstoffe bedienten wir uns der Fällung mit Sublimatalkohol. Es gelang mir gemeinsam mit DÖLP, auf diese Weise aus der Niere des Hundes einen blutdrucksteigernden Stoff darzustellen, der sicher nicht mit den von TIGERSTEDT und BERGMANN sowie anderen Autoren beschriebenen blutdrucksteigernden Substanzen identisch ist. Zur einfacheren Unterscheidung vom hochmolekularen Renin habe ich für diesen Stoff den Namen Nephrin in Vorschlag gebracht. Das Nephrin zeichnet sich durch eine überaus lang anhaltende blutdrucksteigernde Wirkung aus.

Werden einem Hunde in Pernoctonnarkose beide Nieren exstirpiert, sofort in einem Ätherkohlensäuregemisch durchgefroren, zerkleinert und in Sublimatalkohol weiter verarbeitet, so ist in den Extrakten ebenfalls das Nephrin nachweisbar, und zwar auch dann, wenn das Tier zuvor entblutet und das Gefäßsystem mit RINGER-Lösung durchgespült wurde. Danach ist anzunehmen, daß das Nephrin bereits vorgebildet in der gesunden Niere vorhanden ist und nicht erst postmortal durch Autolyse oder Einwirkungen des Blutes entsteht.

Wir suchten nun durch die Bestimmung physikalischer und chemischer Eigenschaften den aus der Niere dargestellten blutdrucksteigernden Stoff näher zu charakterisieren. Bei der Dialyse von Nephrinpräparaten war schon nach 4 Stunden eine deutliche blutdrucksteigernde Wirkung in der Außenflüssigkeit vorhanden und nach 12 Stunden befand sich das Nephrin fast ausschließlich im Außenraum.

Beim Erhitzen erwies sich das Nephrin als kochbeständig in saurer Lösung, während es bei alkalischer Reaktion seine Wirksamkeit weitgehend einbüßt.

Gegen Ultraviolettbestrahlung ist das Nephrin im Gegensatz zu hypophysinähnlichen Stoffen in saurer Reaktion beständig, bei neutraler Lösung wird die Blutdruckwirkung nur mäßig herabgesetzt.

Von hypophysinartigen Substanzen unterscheidet sich das Nephrin auch durch sein Verhalten gegenüber Adsorptionsmitteln. Weder an Tierkohle noch an Kaolin, Tonerde, Kieselgur und Talkum ist das Nephrin in spezifischer Weise adsorbierbar.

Hinsichtlich der Löslichkeit ergaben sich folgende Verhältnisse: Das Nephrin ist gut löslich in Wasser und Alkohol bis 80%, mäßig in absolutem Alkohol und Aceton. Es löst sich in Eisessig und ist unlöslich in Petroläther, Chloroform, Dioxan und Methylenchlorid. Ebenso ist es unlöslich in Äther bei neutraler, soda- und natronalkalischer Lösung, dagegen besitzt es eine geringe Löslichkeit in Äther bei stark saurer Reaktion.

Bei der Aufarbeitung anderer Organe des Hundes, wie Herz, Lunge, Leber, Milz, Nebennieren, Pankreas, Schilddrüse, Hypophyse, Hirn und

Prostata konnte kein Stoff gefunden werden, der dem Nephrin der Niere ähnlich ist.

Auch aus der Niere des Menschen konnte mit Hilfe des Sublimatalkoholverfahrens ein blutdrucksteigernder Stoff dargestellt werden, der hinsichtlich seines Verhaltens gegenüber Lösungs- und Adsorptionsmitteln, bei der Dialyse, Erhitzung und Ultraviolettbestrahlung dem aus der Hundeniere gewonnenen Nephrin völlig entsprach.

Wurden Mark und Rinde getrennt aufgearbeitet, so zeigt sich, daß das Nephrin im wesentlichen in der Rinde vorkommt.

Auch bei der Verarbeitung von anderen Organen des Menschen, wie Milz, Nebennieren, Pankreas, Lunge, Leber, Herz, Muskulatur, Schilddrüse, Hypophyse, Hirn, Prostata und Hoden konnte in keinen dieser Organe ein dem Nephrin der Niere entsprechender Stoff nachgewiesen werden.

Neuerdings fanden v. Euler und Sjöstrand in der Niere und aus ihr hergestellten Präparaten eine blutdrucksteigernde Substanz, die mit dem von mir beschriebenen Nephrin auch hinsichtlich seiner Ätherlöslichkeit und seiner hemmenden Wirkung auf den isolierten Darm — zwei besonders charakteristischen Eigenschaften — übereinstimmt.

Nachdem somit im Nephrin ein zweiter blutdrucksteigernder Stoff der Niere sichergestellt war, lag es nahe, nach genetischen Beziehungen zwischen dem Renin und dem Nephrin zu suchen. Schon bei unseren Dialyseversuchen beobachteten wir, daß nach der Dialyse eines fertigen Extraktes das Nephrin fast völlig aus dem Innenraum verschwunden ist. Wird dagegen Nierenbrei dialysiert, so befindet sich auch nach 12stündiger Dialyse mehr Nephrin im Dialysierrückstand als in der Außenflüssigkeit. Dieser Befund legt genetische Beziehungen zwischen dem nichtdialysablen Renin und dem dialysablen Nephrin nahe.

Neuerdings stellte ich nun Autolyseversuche an Nierenbrei mit und ohne Reninzusatz gemeinsam mit Kulczyckyj-Polivka an: Und zwar wurde Kaninchennierenbrei einmal frisch nach dem Sublimatalkoholverfahren verarbeitet. Der Extrakt zeigt eine starke und anhaltende blutdrucksteigernde Wirkung. Wurde dagegen die gleiche Menge Kaninchennierenbrei erst $5^1/_2$ Stunden der Autolyse im Brutschrank bei 37—40° C unterworfen, so hatte der daraus gewonnene Extrakt nur einen geringen blutdruckerhöhenden Effekt. Wird aber Renin mit Nierenbrei autolysiert, so zeigt der Extrakt eine starke und anhaltende blutdrucksteigernde Wirkung. Renin allein passiert unseren Arbeitsgang nicht. Nach diesen Versuchen ist es wahrscheinlich, daß Nephrin auf fermentativem Wege aus Renin gebildet wird. Das Renin ist der hochmolekulare Stapelstoff der Niere und unter der Wirkung der Nierendurchblutungsstörung wird das niedermolekulare Nephrin in vermehrter Menge aus dem Renin gebildet und an den Kreislauf abgegeben.

Die Tatsache, daß das Nephrin bei Untersuchung zahlreicher Organe nur in der Niere gefunden werden konnte, legt seine Bedeutung für die Entstehung des nephrogenen Hochdrucks nahe. Wir bemühten uns, sie durch Blutuntersuchungen sicherzustellen. Da über die Pathogenese des menschlichen Hochdrucks recht verschiedene Anschauungen vertreten werden, untersuchten wir zunächst das Blut von Hunden mit experimentellem renalem Hochdruck und vergleichen es mit dem von Normaltieren. Der Hochdruck war bei den Hunden, gemeinsam mit Linder und Ansorge durch Drosselung der Nierenarterie mit Hilfe eines Silberdrahtringes erzeugt, der leicht zur Einheilung gebracht werden kann. Der Blutdruck steigt danach erheblich und anhaltend auf systolische Werte von 200 bis 300 mm Hg bei gleichzeitiger Erhöhung des diastolischen Drucks an. Bemerkenswerterweise zeigen diese Tiere über lange Frist bei der Untersuchung des Blutes auf harnpflichtige Stoffe und bei der Prüfung des Konzentrationsvermögens für den Harn keine Störung der Ausscheidungsfunktion der Niere.

Bei der Blutgerinnung und Hämolyse werden unspezifische blutdrucksteigernde Stoffe frei. Es erwies sich deshalb, um eindeutige Versuchsergebnisse zu erzielen, die sorgfältige Verhütung von Blutgerinnung und Hämolyse durch Paraffinieren der verwandten Geräte, Heparinzusatz, rasches Arbeiten und scharfes Abzentrifugieren der geformten Blutbestandteile als notwendig. Bei Untersuchung von etwa 100 Blutproben konnte unter Einhaltung dieser Vorsichtsmaßnahmen mit großer Regelmäßigkeit ein eindeutiger Unterschied in der Blutdruckwirkung der Extrakte von Hochdruckhunden und Normaltieren festgestellt werden.

Den auf diese Weise im Blute des Hochdruckhundes nachgewiesenen blutdrucksteigernden Stoff untersuchten wir auf seine physikalischen und chemischen Eigenschaften. Er zeigte gegenüber der Dialyse, dem Erhitzen, der Ultraviolettbestrahlung, Adsorptions- und Lösungsmitteln völlig das gleiche Verhalten wie das aus der Niere gewonnene Nephrin: kann also mit unter diesen Begriff gefaßt werden. Bei der Intensität und Dauer der blutdrucksteigernden Wirkung der Nephrinmengen, die im Blute nachgewiesen werden konnten, muß diesem eine pathogenetische Bedeutung für die Entstehung des renalen Hochdrucks zugesprochen werden.

Nunmehr ging ich, gemeinsam mit Jelinghoff, an die Untersuchung der Frage, wieweit das Nephrin bei den verschiedenen Hochdruckformen des Menschen im Blute zu finden ist. Mit Hilfe des Sublimatalkoholverfahrens gelang es, bei sorgfältigster Vermeidung von Hämolyse und Blutgerinnung aus dem Heparinplasma beim chronischen renalen Hochdruck des Menschen einen blutdrucksteigernden Stoff zu gewinnen, der bei gleicher Untersuchungstechnik im Plasma des Blutdruckgesunden stets vermißt wurde. Die Substanz fand sich mit großer Regelmäßigkeit bei der chronischen hypertonischen Nephritis, dagegen war sie bei den angewandten

Blutmengen nicht bei den reinen Fällen von akuter diffuser Glomerulonephritis nachweisbar, sondern wurde gelegentlich beobachtet, wenn diese Erkrankung zu einem bereits bestehenden Hochdruck hinzukam. Bei der malignen Sklerose konnten wir mit unserer Methode in einem sehr hohen Prozentsatz der Fälle eine eindeutige blutdrucksteigernde Wirkung der Extrakte feststellen, während eine solche in der Gruppe der essentiellen Hypertonien und Übergangsformen besonders bei den letzteren und den jugendlichen Hochdruckkranken gefunden wurde. Innersekretorisch von seiten der Hypophyse und Nebennieren bedingte Hochdruckformen, wie zwei Fälle von Cushingscher Krankheit ließen unseren blutdrucksteigernden Stoff ebenso vermissen wie ein Fall von Isthmusstenose der Aorta. Der von uns beim hochdruckkranken Menschen im Blute nachgewiesene blutdrucksteigernde Stoff zeigte hinsichtlich des Erhitzens bei saurer und alkalischer Reaktion, der Ultraviolettbestrahlung, der Adsorption an Tonerde und Kieselgur, der Dialyse und der Löslichkeit in Äther bei verschiedener Reaktion völlig das gleiche Verhalten wie das aus Nieren von Hund und Menschen sowie dem Blute des Hundes mit experimentellem Hochdruck gewonnene Nephrin, ist also offenbar mit diesem identisch.

Da das Nephrin dialysabel ist, war anzunehmen, daß es auch im Urin erscheinen würde. Dialysable Stoffe sind sogar meist in wesentlich größerer Konzentration im Urin als im Blute vorhanden. Damit war von Urinuntersuchungen eine Bestätigung und ein weiterer Ausbau unserer bisherigen Untersuchungsergebnisse zu erwarten, zumal die bei Untersuchung größerer Mengen Blutes zu befürchtende Störung der Ergebnisse durch Hämolyse und Gerinnung bei Urinuntersuchungen keine Rolle spielt. Die Prüfung des Harns auf seinen Nephringehalt führte ich in den letzten Jahren gemeinsam mit Kulczyckyj-Polivka unter Herstellung von etwa 1500 Extrakten und deren Auswertung an der Katze durch.

Und zwar untersuchten wir der übersichtlicheren Verhältnisse wegen zunächst wieder Urin von Hochdruckhunden mit Drosselung der Nierendurchblutung und verglichen ihn mit Urin von Normaltieren. Es ließen sich aus dem Urin vom renalen Hochdruck mit Hilfe des Sublimatalkoholverfahrens blutdrucksteigernde Extrakte gewinnen, deren Salzgehalt so niedrig liegt, daß dadurch die Blutdruckwirkung nicht beeinflußt wird. Der Harnstoffgehalt der Urinextrakte ist für die Auswertung der Präparate von einer großen Bedeutung, die von früheren Untersuchern nicht hinreichend berücksichtigt worden ist. Als bestes Mittel zur quantitativen Entfernung des Harnstoffes erwies sich uns ein Ureasepräparat, das mit Hilfe einer 32%igen Acetonlösung gewonnen wurde. Leerversuche zeigten, daß dabei keine blutdruckwirksamen Verunreinigungen in die Extrakte gebracht werden. Nach Ausschaltung des Harnstoffs lassen sich aus dem Urin vom renalen Hochdruck Präparate darstellen, die schon bei Verwendung von 10 ccm Harn eine intensive und lang anhaltende Blutdruck-

steigerung hervorrufen. Die Verarbeitung kleiner Harnmengen bietet den Vorteil, daß störende Begleitstoffe nur in geringen Mengen vorhanden und die Nephrinverluste bei der Präparation niedrig sind. Das aus dem Harn vom renalen Hochdruck dargestellte Produkt zeigt hinsichtlich seines Verhaltens gegenüber Lösungs- und Fällungsmitteln, dem Erhitzen bei saurer und alkalischer Reaktion, der Ultraviolettbestrahlung und der Adsorption an Tierkohle, Kaolin, Talkum, Kieselgur und Tonerde völlig die gleichen Eigenschaften wie das aus Nieren und Blut gewonnene Nephrin, kann also mit diesem als identisch angesehen werden. Damit ist von uns erstmalig der gleiche blutdrucksteigernde Stoff in Niere, Blut und Urin nachgewiesen worden.

In 83 Untersuchungen ließen sich regelmäßig eindeutige Unterschiede zwischen dem Verhalten des Harns von Hochdruckhunden und Normaltieren feststellen. Bei Verwendung von 10 ccm Urin verursachten die Extrakte vom Hochdruckhund eine anhaltende und intensive Blutdrucksteigerung, während die vom Normaltier keine wesentliche Änderung des Blutdrucks hervorriefen. Bei Verarbeitung sehr großer Harnmengen erzeugen auch Extrakte aus Normalurinen eine Blutdrucksteigerung. Auf Grund von physikalischen und pharmakologischen Untersuchungen ist es jedoch sicher, daß es sich dabei nicht ausschließlich um eine Nephrinwirkung handelt.

Die quantitativen Nephrinbestimmungen im Urin beim experimentellen renalen Hochdruck erbringen einen weiteren Beweis für die pathogenetische Bedeutung des Nephrins. Außerdem zeigen diese Untersuchungen, daß es bei Behinderung der Nierendurchblutung zu einer Mehrausschüttung von Nephrin aus der Niere und nicht allein durch eine Ausscheidungsstörung zur Nephrinanreicherung im Blute kommt. Ein Vergleich der geschilderten Blut- und Urinuntersuchungen beim experimentellen renalen Hochdruck läßt vielmehr erkennen, daß der Nephrinnachweis im Blute bei vermehrter Nephrinausscheidung im Harn in einem Stadium der Erkrankung gelingt, in dem die Untersuchung des Blutes auf harnpflichtige Eiweißschlacken und das Konzentrationsvermögen für den Urin noch keine Ausscheidungsstörung der Niere anzeigt. Das heißt also: Die Ausscheidungsfunktion der Niere und die Harnproduktion sind keineswegs zwangsläufig gekoppelt mit der innersekretorischen Funktion der Niere, der Abgabe des Nephrins an das Blut.

Nachdem so das Nephrin auch im Harn des Hundes mit experimentellem renalem Hochdruck nachgewiesen worden war und ein eindeutiger Unterschied in der blutdrucksteigernden Wirkung der Harnextrakte solcher Tiere gegenüber denen von Normalhunden feststand, gingen wir dazu über, nach dem Nephrin im Urin von hochdruckkranken Menschen zu fahnden. Bei der Aufarbeitung solcher Harne leistete uns das eben beschriebene Sublimatalkoholverfahren mit Zerstörung des Harnstoffes durch Urease gute Dienste. Das aus dem Harn von hochdruckkranken Menschen gewonnene Nephrin

stimmt in allen untersuchten physikalischen und chemischen Eigenschaften mit den aus Hundeharn, Blut und Niere gewonnenen Präparaten überein. Die erste Abbildung gibt die Nephrinausscheidung, gemessen an Höhe und Dauer der Blutdruckwirkung von etwa 150 Ureaseprodukten im Vergleich zu 250 γ Tyramin bei Blutdruckgesunden und Hochdruckerkrankungen verschiedener Art wieder. Die mit *T* bezeichnete Säule zeigt die Blutdruckwirkung von 250 γ Tyramin, Säule *I* die der Normalurine.

Säule *II* gibt die Nephrinausscheidung der Fälle mit chronischer Nephritis wieder. Hier übertrifft die Blutdruckwirkung der Extrakte die der Normalurine um das Mehrfache. Andererseits macht sich gegenüber anderen Formen des Hochdrucks in der etwas geringeren Nephrinmenge im Harn die durch Ausscheidungsstörungen bei der chronischen Nephritis bedingte Nephrinretention im Blute bemerkbar. Außerdem lehrt die klinische Beobachtung, daß bei schweren Formen der Niereninsuffizienz der Blutdruck auf völlig normale systolische und diastolische Werte nach stärksten Blutdrucksteigerungen absinken kann. Diese Erscheinung läßt darauf schließen, daß mit zunehmendem Versagen der Nierenleistung auch die Nephrinproduktion nachläßt.

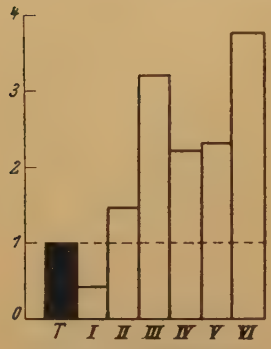


Abb. 1. Durchschnittliche Blutdruckwirkung an der Urethankatze: *T* von 250 γ Tyramin; *I* der Urinextrakte von Blutdruckgesunden; *II* der Urinextrakte von chronischen Nephritiden; *III* der Urinextrakte von malignen Sklerosen; *IV* der Urinextrakte von diffusen akuten Glomerulonephritiden; *V* der Urinextrakte von essentiellen Hypertonien und Übergangsformen; *VI* der Urinextrakte von Schwangerschaftseklampsien.

Säule *III* gibt die Nephrinausscheidung der malignen Sklerosen wieder. Entsprechend den bei den Blutuntersuchungen gemachten Beobachtungen bestätigen auch die Urinbefunde, daß diese Hochdruckform im wesentlichen nephrogenen Ursprungs ist, und die Nephrinausschüttung entsprechend dem bösartigen Charakter dieser Erkrankung eine besonders starke ist.

Aber auch bei den Fällen von akuter diffuser Glomerulonephritis, die Säule *IV* darstellt, finden wir eine vermehrte Nephrinausscheidung, ein Beweis dafür, daß der Hochdruck auch bei dieser Erkrankung chemisch von der Niere aus bedingt wird.

Säule *V* gibt die Nephrinausscheidung bei sog. essentiellen Hypertonien und Übergangsformen wieder, bei denen die Nierenfunktionsprüfung noch keine deutliche Herabsetzung des Ausscheidungsvermögens der Niere erkennen läßt. Auch hier finden wir eine vermehrte Nephrinmenge im Harn, ein weiterer Beweis dafür, daß eine gute Ausscheidungsfunktion der Niere noch nicht die nephrogene Genese eines Hochdrucks ausschließt. Bei Hochdruckformen mit intaktem Ausscheidungsvermögen der Niere und nicht sehr starker Steigerung der Nephrinproduktion wird der Nephrinnachweis im Harn leichter gelingen als im Blute.

Eine besonders hohe Nephrinausscheidung läßt die Eklampsie der Schwangeren erkennen (Säule VI). Da über die Pathogenese dieser Erkrankung noch recht verschiedene Meinungen herrschen, ist der Befund, der diese Hochdruckform unter die Nierenkrankheiten einordnet, auch von Bedeutung für die Ätiologie des ganzen Krankheitsbildes, das von VOLHARD in Parallele zur akuten diffusen Glomerulonephritis gestellt wurde.

Die ursächliche Bedeutung des Nephrins für die Entstehung des Hochdrucks kommt bei der Eklampsie, wie Abb. 2 zeigt, auch sehr gut zum Ausdruck, wenn man die Blutdruckkurve und die Nephrinausscheidung im Verlauf der Erkrankung nebeneinander zur Darstellung bringt. Die Abbildung zeigt im Beginn der Erkrankung bei einer erheblichen Blutdrucksteigerung eine starke Erhöhung der Nephrinausscheidung und ganz parallel mit dem Absinken des Blutdrucks bis zur Norm geht auch die Nephrinausscheidung allmählich bis auf einen ganz geringen Wert zurück. Ähnliche Beobachtungen konnten auch im Verlaufe der akuten diffusen Glomerulonephritis gemacht werden.

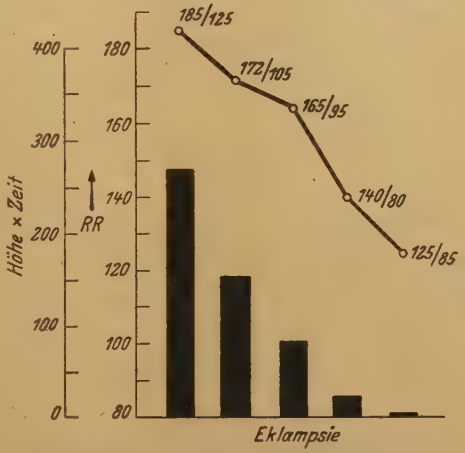


Abb. 2. Die Kurve gibt die Blutdruckwerte einer Schwangerschaftseklampsie wieder. Die Säulen stellen die Blutdruckwirkung der Urinextrakte zur gleichen Zeit dar.

Nachdem somit die Bedeutung des Nephrins für die Entstehung des experimentellen und des menschlichen renalen Hochdrucks sichergestellt war, lag die Frage nahe, welche physiologischen Mechanismen dieser Blutdrucksteigerung zugrunde liegen. Diesem Problem ging ich in letzter Zeit vor allem mit SEITZ nach. Sowohl am isolierten Kaninchenohr wie an der hinteren Froschextremität nach TRENDELENBURG ergeben Extrakte vom renalen Hochdruck eine erhebliche und lang anhaltende Abnahme der Durchströmung, die beim Normalextrakt fehlt, wie Abb. 3 zeigt.

Am isolierten Froschherzen nach STRAUB verursachen schon Extrakte aus 0,5 ccm Urin vom renalen Hochdruck eine intensive und nachhaltige Steigerung der Hubhöhe und Schlagzahl. Das bereits stillstehende Herz begann nach Zufuhr solcher Extrakte wieder zu arbeiten und der fördernde Einfluß des Nephrinpräparates auf das geschädigte Herz war stärker als der von Strophanthin, Adrenalin, Sympatol und anderen Kreislaufmitteln.

Außerdem besteht aber auch eine direkte Wirkung des Nephrins auf das Zentralnervensystem. In dieser Richtung deutete schon der Befund, daß die Nephrinwirkung auf den Blutdruck im Tierversuch sehr wesentlich

von der Narkoseart und der Tiefe der Narkose abhängt. An decerebrierten Tieren ist die Blutdruckwirkung sehr viel geringer als an Normaltieren. Wird dem gleichen Tiere eine Extraktmenge, die so klein ist, daß sie bei der Injektion in die V. femoralis kaum eine Blutdruckwirkung hervorruft, in die A. carotis injiziert, so tritt eine deutliche Blutdrucksteigerung ein. Beim Adrenalin ist das Verhalten umgekehrt. Die Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung ist ohne wesentlichen Einfluß.

Durch Cocain wird die Nephrinwirkung nicht verstärkt, durch Ergotamin nicht aufgehoben. Bei wiederholter Injektion am gleichen Tiere besteht keine deutliche Tachyphylaxie. Am isolierten Meerschweinchenuterus ließen sich durch Nephrin keine Kontraktionen auslösen. Extrakte vom renalen Hochdruck hemmten schon bei einer Ausgangsmenge von $1^1/_2$—2 ccm Urin die Tätigkeit des isolierten Meerschweinchendünndarms. Im Diureseversuch an Ratten und an der narkotisierten Katze ließ sich niemals eine diuresehemmende Wirkung der Extrakte nachweisen. Das enukleierte Froschauge zeigte auf Hochdruckextrakte eine Erweiterung der Pupille, die auf Normalextrakte vermißt wurde.

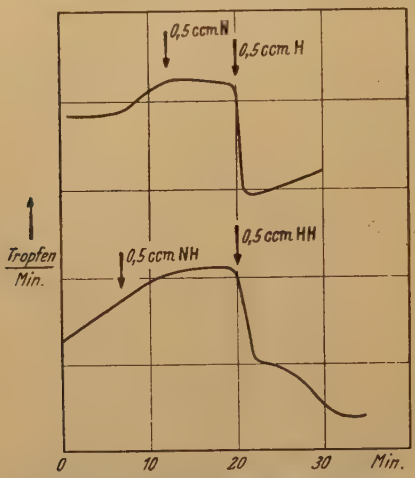


Abb. 3. Durchströmung der hinteren Froschextremitäten nach Trendelenburg. *N* Urinextrakt vom blutdruckgesunden Menschen; *H* Urinextrakt vom Kranken mit renalem Hochdruck; *NH* Urinextrakt vom Normalhund; *HH* Urinextrakt vom Hochdruckhund.

Auch beim Vergleich des physiologischen Verhaltens der Nephrinpräparate aus Niere, Blut und Urin stimmten diese in sämtlichen untersuchten Eigenschaften überein. Andererseits zeigten diese Untersuchungen ebenfalls, daß das Nephrin sicher nicht mit dem Renin, Tonephin, Adrenalin, Tyramin und Oxytyramin identisch ist.

Abschließend seien die wichtigsten Untersuchungsergebnisse nochmals kurz zusammengefaßt: Neben dem von Tigerstedt und Bergmann gefundenen alkoholunlöslichen Renin konnte ich mit meinen Mitarbeitern in der Niere das alkohollösliche Nephrin nachweisen. Ein dem Nephrin ähnlicher Stoff ließ sich bei Untersuchung sehr zahlreicher Organe in keinem von ihnen finden. Das nicht dialysable Renin, dem keine direkte Bedeutung für die Blutdruckregulation zukommt, dient als Stapelstoff in der Niere und wird unter dem Einfluß einer ungenügenden Blutversorgung der Niere wahrscheinlich fermentativ in das dialysable Nephrin umgewandelt, das aus der Niere in die Blutbahn gelangt. Versuche mit der Reinschen Stromuhr sprechen dafür, daß dieser Mechanismus für die Regulation der

Nierendurchblutung unter physiologischen Verhältnissen von Bedeutung ist. Wird beim Hunde die Nierendurchblutung gedrosselt, so ist eine vermehrte Nephrinabgabe an das Blut nachweisbar: Extrakte aus dem Blute von Hochdruckhunden und Normaltieren zeigen eindeutige Unterschiede in der Wirkung auf den Blutdruck der Urethankatze. Auch im Urin ist Nephrin in vermehrten Mengen beim Hochdruckhund gegenüber dem Normaltier nachweisbar. Die aus Niere, Blut und Urin des Hundes sowie des Menschen gewonnenen Nephrinpräparate stimmen in allen untersuchten physikalischen, chemischen und physiologischen Eigenschaften überein. Störungen in der Ausscheidnng von Stoffwechselschlacken durch die Niere im Urin und die Abgabe von Nephrin an das Blut sind nicht zwangsläufig miteinander verknüpft. Auch bei Menschen mit renalem Hochdruck ist das Nephrin zum Unterschied vom Normotoniker im Blut und Urin in vermehrten Mengen nachweisbar. Dadurch wird die Bedeutung des Nephrins für die Hochdruckentstehung sichergestellt. Die Vermehrung der Nephrinausscheidung bei sehr zahlreichen Formen des menschlichen Hochdrucks erweist die zentrale Bedeutung der Niere für die Pathogenese der Hypertonie. Der physiologische Mechanismus, durch den das Nephrin die Blutdrucksteigerung hervorruft, setzt sich zusammen aus einer Kontraktion der peripheren Gefäße, einer Steigerung der Schlagzahl und Hubhöhe des Herzens und einer direkten Einwirkung des Nephrins auf das Zentralnervensystem.

Literatur.

Enger, R.: Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. **1939**. — Enger, R. u. F. Dölp: Z. klin. Med. **139**, H. 5/6 (1941). — Enger, R. u. H. Gerstner: Z. exper. Med. **102** (1938). — Enger, R. u. W. Jelinghoff: Z. klin. Med. **139**, H. 5/6 (1941). — Enger, R. u. J. Kulczyckyj-Polivka: Z. klin. Med. **143**, H. 4 (1944). — Enger, R., F. Linder u. H. Sarre: Z. exper. Med. **104**, 1—9 u. 10—14 (1938). — Euler, U. S. v. u. T. Sjöstrand: Acta physiol. scand. (Schwd.) **5**, 183—187 (1943). — Naturw. **31**, H. 11/13 (1943). — Taggart, J. and D. R. Drury: J. exper. Med. (Am.) **71** (1940). — Tigerstedt u. Bergmann: Skand. Arch. Physiol. (D.) 8 (1898). — Volhard, F.: In Bergmann-Staehelins Handbuch der inneren Medizin, Bd. 6. 1931.

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut (Prof. Dr. P. Holtz) und dem Pharmakologischen Institut (i. V. Prof. Dr. P. Holtz) der Universität Rostock.

Über das sympathicomimetische pressorische Prinzip des Harns („Urosympathin").

Von

Peter Holtz, Karl Credner und Günther Kroneberg.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. Oktober 1944.)

Untersuchungen[1] über die physiologische Bedeutung der *Dopadecarboxylase* hatten ergeben, daß die Wirkung des von uns[2] in verschiedenen Organen nachgewiesenen und besonders reichlich in der Nierenrinde vorhandenen Fermentes auch unter physiologischen Verhältnissen, in vivo in Erscheinung tritt, indem es nach enteraler oder parenteraler Belastung mit Dioxyphenylalanin (Dopa) bei Mensch und Tier zur Ausscheidung von Oxytyramin, dem Produkt der Fermentwirkung, in den Harn kommt. Weitere Versuche machten wahrscheinlich, daß *Oxytyramin* als vermutlich regelmäßig im intermediären Stoffwechsel entstehende Vorstufe des Adrenalins, soweit es nicht der Hormonbildung dient, von der Niere ausgeschieden wird und sich somit auch ohne voraufgegangene experimentelle Zufuhr von Dopa als normaler Bestandteil im Harn findet. Besonders beim Menschen lag das „Harnoxytyramin" zum größten Teil in *gebundener*, pharmakologisch unwirksamer Form vor, aus der durch kurz dauernde Säurehydrolyse die *freie*, wirksame Form erhalten werden konnte. In der Ausscheidung überschüssiger Anteile erblickten wir ebenso wie im oxydativen Abbau durch die Aminoxydase der Organe einen Entgiftungsmechanismus, der den Organismus vor unerwünschten Kreislaufwirkungen des unkontrollierbar von mehreren Körperorganen produzierten Amins schützen soll. Es wurde auf Beziehungen zum Krankheitsbild des arteriellen Hochdrucks hingewiesen, die sich im Falle einer Überproduktion des Amins bzw. eines Versagens der Schutz- und Entgiftungsmechanismen ergeben würden.

Die vorliegende Arbeit enthält neue Versuchsergebnisse über die *Natur* der sympathicomimetischen blutdrucksteigernden Substanz, ferner

[1] Holtz, P. u. K. Credner: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **200**, 356 (1942). —
[2] Holtz, P., R. Heise u. K. Lüdtke: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **191**, 87 (1938). Holtz, P.: Naturw. **1939**, 724. — Erg. Physiol. **44**, 230 (1941). — Holtz, P., K. Credner u. Chr. Strübing: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **199**, 145 (1942).

Untersuchungen über die zur Ausscheidung kommenden *Mengen* und ihre Beeinflussung durch *Arbeitsleistung*, schließlich einige Untersuchungen über die pressorische Wirksamkeit des Harns von Patienten mit *essentieller Hypertonie*. — Die Aufarbeitung der Harne erfolgte nach der gleichen Methode, die wir [1] schon früher zur Isolierung von Oxytyramin aus Harn angewandt hatten, und die sich auf das von SHAW [3] zur kolorimetrischen Bestimmung von Adrenalin beschriebene Verfahren stützt.

Prinzip der Methode. In den meisten Fällen wurde $^1/_5$ der Tagesmenge Harn aufgearbeitet. Nach Vorreinigung mit Bleiacetat bei leicht essigsaurer Reaktion wird der wirksame Stoff bei p_H 8 mit Ammoniak als Bleisalz gefällt. Dieses wird mit Schwefelsäure zersetzt. Um die gebundenen, pharmakologisch unwirksamen Anteile in Freiheit zu setzen, wird 20 Min. lang bei 100° hydrolysiert. Anschließend wird mit Aluminiumhydroxyd bei p_H 8 adsorbiert und 2mal mit je 3 ccm saurem Phosphat (3%iger NaH_2PO_4-Lösung) eluiert, so daß 6 ccm Eluat $^1/_5$ der Tagesmenge Harn entsprechen. — Die Eluate werden am Blutdruck der mit Pernocton * narkotisierten Katze, des mit Urethan narkotisierten Kaninchens sowie am isolierten Kaninchen- und Meerschweinchendarm untersucht.

Über die Natur der pressorischen Substanz des Harns.

In unserer ersten Arbeit [2] über Nachweis und Wirkung der Dopadecarboxylase war es uns gelungen, in den aus Nierenextrakt und Dopa bestehenden Versuchsansätzen das gebildete Oxytyramin durch Benzoylierung zu isolieren und chemisch zu identifizieren. Gleichartige Versuche, in angereicherten Harneluaten Oxytyramin** *chemisch* zu erfassen, schlugen fehl, obwohl die nach der *biologischen* Auswertung zu erwartenden Aminmengen hierzu hätten ausreichen müssen. Es entstanden deshalb Zweifel an der Richtigkeit unserer seinerzeit geäußerten, auf einige orientierende Versuche sich stützenden Vermutung, die vasopressorische Substanz des Harns sei identisch mit Oxytyramin.

Eine Nachprüfung unserer damaligen Befunde [1] an mehr als 100 Harnen führte zu dem Ergebnis, daß die oxytyraminähnliche Substanz des normalen Harns nicht mit Oxytyramin identisch sein kann, wenigstens nicht nur aus Oxytyramin besteht. *In Bestätigung* unserer früheren Angaben wirkten die Harneluate ähnlich wie Oxytyramin und Adrenalin *blutdrucksteigernd* an der Katze, *lähmend* auf den isolierten Kaninchen- und Meerschweinchendarm; durch Cocain wurde ihre Blutdruckwirkung wie diejenige des Oxytyramins und Adrenalins und im Gegensatz zu derjenigen des Tyramins oder Amylamins verstärkt. Durch Schütteln der Lösungen mit Luftsauerstoff bei alkalischer Reaktion oder nach Zusatz von Kartoffelpolyphenoloxydase wird die Wirksamkeit wie diejenige des Oxytyramins und Adrenalins zerstört. — *Im Gegensatz* aber zu unseren

[3] SHAW, F. H.: Biochem. J. (Brit.) **32**, 19 (1938).

* Für die Überlassung von Pernocton danken wir der Firma I. D. Riedel-E. de Haen, Berlin. — ** Für die Überlassung von Oxytyramin danken wir der Firma E. Merck, Darmstadt.

damaligen Beobachtungen, daß die Pressorsubstanz des Harns wie Oxytyramin blutdruck*senkend* am Kaninchen wirkt und sich dadurch gegen Adrenalin abgrenzen läßt, ergibt sich aus dem uns jetzt vorliegenden großen Versuchsmaterial, daß es in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle auch am Kaninchen zu einer blutdruck*steigernden* Wirkung kommt. Die hierdurch nahegelegte Annahme, die wirksame Substanz des Harns sei Adrenalin, trifft aber keinesfalls zu. Denn am *Katzenblutdruck* deutlich wirksame, z. B. mit 10 γ Adrenalin äquivalente Mengen verursachen am *Kaninchen* nur eine ganz geringfügige pressorische Wirkung, die jetzt meistens nur noch derjenigen von etwa 2—3 γ Adrenalin gleichkommt (Abb. 1). Versuche am isolierten *Darm* hatten das Ergebnis, daß am Katzenblutdruck mit Adrenalin und Oxytyramin gleich wirksame Mengen jetzt *schwächer* als Adrenalin, aber *stärker* als Oxytyramin lähmen (Abb. 2 A).

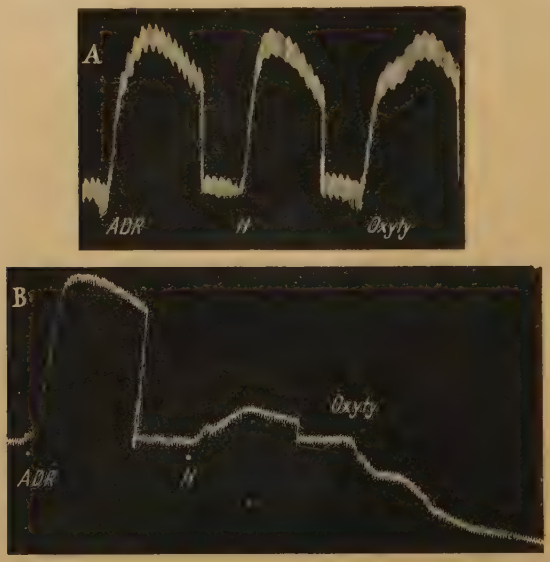


Abb. 1 A u. B. Die pressorische Wirkung des Harns am Katzen- und Kaninchenblutdruck.
A Katze, 2,4 kg. Pernoctonnarkose. Blutdruckmessung in der Art. femoralis. Injektionen in die V. jugularis. *ADR* 7,5 γ Adrenalin; *H* 1,5 ccm Harneluat; *Oxyty* 200 γ Oxytyramin. B Kaninchen. 2,1 kg. Urethannarkose. Blutdruckmessung in der Art. carotis. *ADR* 10 γ Adrenalin; *H* 2,0 ccm Harneluat; *Oxyty* 250 γ Oxytyramin.

Während die Lähmungswirkung des Oxytyramins sich in diesem Versuch am Meerschweinchenrectum allmählich und stufenweise entwickelt, verursacht der Harn ähnlich wie Adrenalin einen plötzlichen und steilen Tonusabfall. — Die Befunde würden mit der Annahme vereinbar sein, daß es sich bei dem blutdrucksteigernden und darmlähmenden Prinzip des Harns um ein Gemisch von Oxytyramin und Adrenalin handele, wie insbesondere vergleichende Versuche mit verschieden zusammengesetzten Adrenalin-Oxytyramingemischen ergaben.

Weitere Untersuchungen zeigten nun aber, daß der pressorische Effekt des Harns zum Unterschied von demjenigen des Adrenalins und Oxytyramins durch *Ergotoxin* oder *Yohimbin* keine so deutliche Umkehr in einen depressorischen, sondern häufig sogar nur eine Abschwächung erfährt (Abb. 3). Es muß deshalb noch eine andere Möglichkeit in Betracht gezogen werden. Diese ergibt sich auf Grund folgender Überlegungen.

Die Arbeiten von CANNON [4] über den *Sympathicusstoff* haben zu der Erkenntnis geführt, daß die humorale Übertragung *sympathischer* Nervenerregungen im Gegensatz zu derjenigen *parasympathischer* Erregungen nicht durch eine einzige Substanz, etwa Adrenalin, besorgt wird, daß vielmehr die Beteiligung zweier verschiedener Überträgerstoffe anzunehmen ist, von denen der eine sicher nicht mit Adrenalin identisch ist. Das „*Sympathin I*" (inhibitory), das z. B. nach Reizung der Nn. splanchnici frei

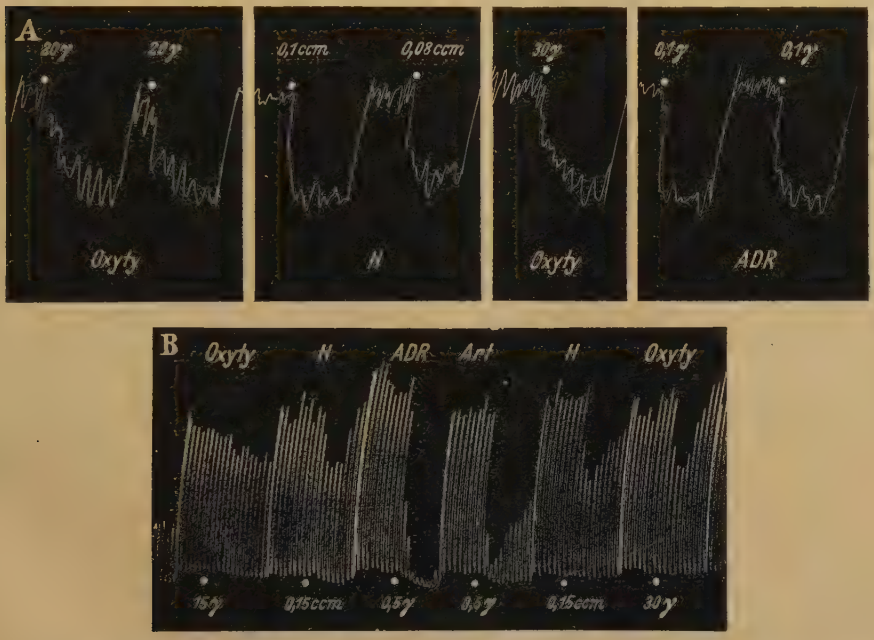


Abb. 2 A u. B. Die Wirkung blutdruckäquivalenter Mengen Harn, Oxytyramin, Adrenalin und Arterenol auf den Darm.

Tyrodelösung, 37°. Volumen des Versuchsgefäßes 20 ccm. *Oxyty* Oxytyramin; *H* Harneluat; *ADR* Adrenalin; *Art* Arterenol. A. Meerschweinchenrectum. Äquivalent am Katzenblutdruck waren: 1 ccm Harn/100 γ Oxytyramin/4 γ Adrenalin. Äquivalent am Darm sind: 0,1 ccm Harn je 30 γ Oxytyramin / 0,1 γ Adrenalin. Im Verhältnis zur pressorischen Wirksamkeit ist die darmlähmende Wirkung des Harns 4mal schwächer als diejenige des Adrenalins, 3mal stärker als diejenige des Oxytyramins. B. Kaninchendünndarm. Äquivalent am Katzenblutdruck waren: 1,5 ccm Harneluat/150 γ Oxytyramin/5 γ Adrenalin bzw. Arterenol. Im Verhältnis zur pressorischen Wirksamkeit wirkt Arterenol am Darm schwächer als Adrenalin, der Harn stärker als Oxytyramin, aber schwächer als Arterenol und Adrenalin.

wird — zum Teil durch Ausschüttung aus dem Nebennierenmark —, dürfte wohl mit Adrenalin identisch sein und unterscheidet sich, wie dieses, durch seine an einer Reihe von Testobjekten nachweisbare Lähmungswirkung vom „*Sympathin E*" (excitatory), das z. B. bei elektrischer Stimulation

[4] CANNON, W. B. u. Z. M. BACQ: Amer. J. Physiol. **96**, 392 (1931). — CANNON, W. B. u. A. ROSENBLUETH: Amer. J. Physiol. **104**, 557 (1933). — Siehe BACQ, Z. M.: Ann. Physiol. (Fr.) **10**, 467 (1934). — Erg. Physiol. **37**, 82 (1935).

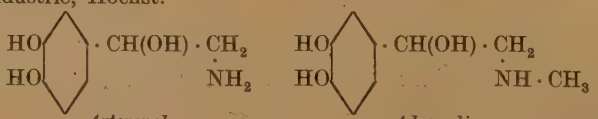
der mit der Art. hepaticoduodenalis verlaufenden sympathischen „Lebernerven" oder des unteren abdominalen Grenzstranges in Aktion tritt, und in dessen Wirkungsbild die lähmende Komponente weniger stark ausgeprägt ist. Die Differenzierung der Sympathine I und E, deren beider Wirkung durch *Cocain* verstärkt wird, läßt sich besonders gut nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit *Ergotoxin* durchführen. Während Adrenalin und elektrische Reizung der Nn. splanchnici („Sympathin I") jetzt eine *depressorische* Wirkung an der Katze haben und den in situ belassenen Uterus zur Erschlaffung bringen, verursacht Stimulation des unteren Grenzstranges oder der „Lebernerven" („Sympathin E") trotz Ergotoxin *Blutdrucksteigerung* und läßt die Uterusmuskulatur unbeeinflußt. Reizung des Halsmarkes am decerebrierten Tier veranlaßt nach Ergotoxin *Blutdruckabfall:* Überwiegen des „Sympathins I" = Adrenalin durch Ausschüttung aus den Nebennieren, *Blutdruckanstieg* nach Entfernung der Nebennieren: reine „Sympathin E"-Wirkung. Untersuchungen von Greer[5] und Mitarbeitern machen es wahrscheinlich, daß Sympathin E mit *Arterenol** (Norepinephrin, Dioxyphenyläthanolamin) identisch ist.

Der Wert dieser Befunde für die Deutung unserer eigenen Versuchsergebnisse liegt darin, daß das pressorische Prinzip des Harns, das wir der einfacheren Kennzeichnung wegen Harnsympathin oder „*Urosympathin*" nennen werden, sich in wesentlichen Punkten von Sympathin I-Adrenalin unterscheidet und mit Sympathin E-Arterenol übereinstimmt. Wie beim Arterenol und im Gegensatz zu Adrenalin ist beim Urosympathin die inhibitorische Wirkungskomponente schwächer ausgeprägt, indem, wie schon erwähnt, mit Adrenalin blutdruckäquivalente Mengen, z. B. am Darm eine deutlich schwächere Lähmungswirkung besitzen (Abb. 2). Nach Ergotoxin oder Yohimbin kommt es ähnlich, wie beim Arterenol, in manchen Fällen nur zu einer *Abschwächung*, aber nicht, wie beim Oxytyramin und noch weit ausgeprägter beim Adrenalin, zu einer *Umkehr* der pressorischen Wirkung (Abb. 3 B). — Andererseits jedoch bestehen auch wiederum Wirkungsunterschiede zwischen Sympathin E-Arterenol und Urosympathin: am *Katzen*blutdruck mit Adrenalin gleich wirksame Arterenolmengen erweisen sich im Gegensatz zu Urosympathin auch am *Kaninchen*blutdruck als nahezu äquivalent.

Die Annahme, das pressorische Prinzip des Harns bestehe aus Oxytyramin und Arterenol, könnte die beobachteten Wirkungen erklären.

[5] Greer, C. M., J. O. Pinkston, J. H. Baxter and E. S. Brannon: J. Pharmacol. (Am.) **62**, 189 (1938). —

* Die Überlassung von Arterenol verdanken wir Herrn Professor Schaumann, I.G.-Farbenindustrie, Höchst.



Arterenol *Adrenalin*

Die Beimischung von *Arterenol* würde verständlich machen, weshalb die blutdrucksteigernde Wirkung des Gemisches an der Katze im Gegensatz zu derjenigen des reinen Oxytyramins durch Yohimbin manchmal nur eine Abschwächung, aber keine Wirkungsumkehr erfährt. Eine Beimischung von *Oxytyramin* würde erklären, weshalb es am Kaninchenblutdruck zu der so besonders charakteristischen Abschwächung der pressorischen

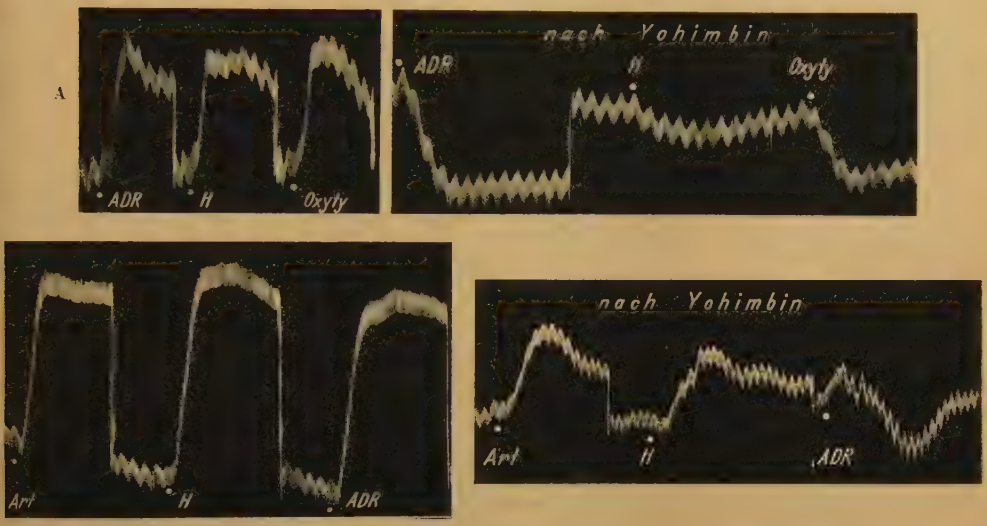


Abb. 3 A u. B. Beeinflussung der pressorischen Wirkung des Harns durch Yohimbin. A. Katze, 2,4 kg. Pernoctonnarkose. — Yohimbin: 7 mg/kg. Vergleich mit Adrenalin und Oxytyramin. *ADR* 5 γ; *H* 1,6 ccm Harn; *Oxyty* 150 γ. B. Katze, 3 kg. — Pernocton. — Yohimbin. Vergleich mit Adrenalin und Arterenol. *H* 2 ccm Harneluat; *ADR* 10 γ; *Art* 10 γ Arterenol.

Urosympathinwirkung kommt; denn das hier rein depressorisch wirkende Oxytyramin müßte die pressorische, adrenalinähnliche Arterenolwirkung antagonistisch beeinflussen.

Obwohl somit die tatsächlichen Befunde mit der Annahme eines im Harn vorliegenden Gemisches aus zwei Komponenten — Arterenol und Oxytyramin — ausreichend erklärt zu sein scheinen, dürfte es wahrscheinlich sein, daß Adrenalin als dritte Komponente beteiligt ist, so daß „Urosympathin" sich aus den drei sympathicomimetischen Aminen *Oxytyramin*, *Arterenol* und *Adrenalin* zusammensetzen würde.

Der Gehalt des Harns an „Urosympathin" und seine Beeinflussung durch Arbeitsleistung.

Die Auswertung des Urosympathingehaltes des Harns am Katzenblutdruck wurde meistens gegen Oxytyramin vorgenommen. Die aus unserem Versuchsmaterial sich für die 24-Stundenmenge ergebenden

Werte entsprechen 2—3 mg Oxytyramin. Den früher [1] einmal angegebenen, mit 4 mg Oxytyramin äquivalenten Wert haben wir unter normalen Verhältnissen nicht wieder beobachtet. Oxytyramin wirkt an der Katze 20—30mal schwächer als Adrenalin oder Arterenol, so daß die Tagesmenge ausgeschiedenen Urosympathins mit 100—150 γ Adrenalin bzw. Arterenol wirkungsgleich wäre. Die Schwankungsbreite dürfte nicht nur individuell bedingt sein, sondern auch auf einem von Fall zu Fall verschiedenen *Mischungsverhältnis* der drei Sympathinkomponenten beruhen. Darauf weist die Beobachtung hin, daß die Wirkung der aus verschiedenen Harnen hergestellten Eluate durch Cocain häufig verschieden stark sensibilisierbar ist und auch durch Ergotoxin oder Yohimbin quantitativ unterschiedlich beeinflußt wird.

Die Frage nach der *Herkunft* des Harnsympathins möchten wir für die *Oxytyraminkomponente* im Sinne unserer früheren Erörterungen dahin beantworten, daß das im Harn sich findende Oxytyramin dem der Hormonbildung, der Bildung von Sympathin E und I entgangenen bzw. für sie nicht benötigten Anteil entspricht. Seine Menge müßte möglicherweise *ernährungsmäßig* beeinflußbar sein, da die in mehreren Organen erfolgende Oxytyraminbildung vom Substratangebot, d. h. von der verfügbaren Dopamenge weitgehend abhängig ist. Demgegenüber muß jedoch daran erinnert werden, daß Dopa als Baustein tierischer Eiweißkörper wenigstens bisher noch nicht nachgewiesen, sondern nur in pflanzlichem Material vereinzelt aufgefunden wurde*. Unter diesen Gesichtspunkten dürfte dem Faktor „Ernährung" wohl kaum eine ins Gewicht fallende Bedeutung zukommen, und die Bildung von Oxytyramin im intermediären Stoffwechsel ihrem Umfang nach vielleicht durch das aus dem Körpereiweiß stammende *Tyrosin* bestimmt sein, — in dem Maße, als dieses durch Oxydation am Benzolring in Dopa überginge. Da aber nicht nur aus *Körper-*, sondern auch aus *Nahrungseiweiß* Tyrosin verfügbar wird, würde somit die Art der Ernährung doch und trotz allem Einfluß auf das Ausmaß der Oxytyraminbildung zu gewinnen vermögen. In diesem Zusammenhang verdient eine kurze Anmerkung Cannons [6] in einer seiner Arbeiten Beachtung, daß die elektrische Reizung sympathischer Strukturen bei seinen Versuchskatzen besonders deutliche Ausschläge gab, "if the animals have recently been fed and preferably are well advanced in the digestion of a meal of protein food".

Sympathin E und I, Arterenol und Adrenalin, werden im Bereich sympathischer Nervenendigungen frei, wenn diese in Erregung geraten, und können auf dem Blutwege auch an entfernten Stellen im Körper Wirkungen ausüben. Zu einer weiteren Quelle für Adrenalin kann das Nebennierenmark als Depotorgan und gleichzeitig wohl auch wichtigste Bildungsstätte

* Über das Vorkommen von Dopa in der Natur siehe Fußnote 1, S. 382.

[6] Cannon, W. B. u. A. Rosenblueth: Amer. J. Physiol. **104**, 557 (1933).

werden. Es liegt nahe, zu fragen, ob die Nebennieren auch für *Arterenol* Produktions- und Stapelorgan sind. Einige orientierende Versuche lassen das als möglich erscheinen.

Methodik. Nebennieren verschiedener Tierarten werden nach FROWEIN[7] extrahiert: 0,5 g Nebennieren wird mit 2,5 ccm n/10 HCl verrieben und nach Zusatz von 7,5 ccm aq. dest. in einem Becherglas zum Sieden erhitzt. Nach Zugabe von 0,8 ccm 10%iger Natriumacetatlösung wird nochmals kurz aufgekocht. Die durch Zentrifugieren erhaltene klare Lösung wird mit NaOH fast neutralisiert und am Katzenblutdruck mit Adrenalin verglichen.

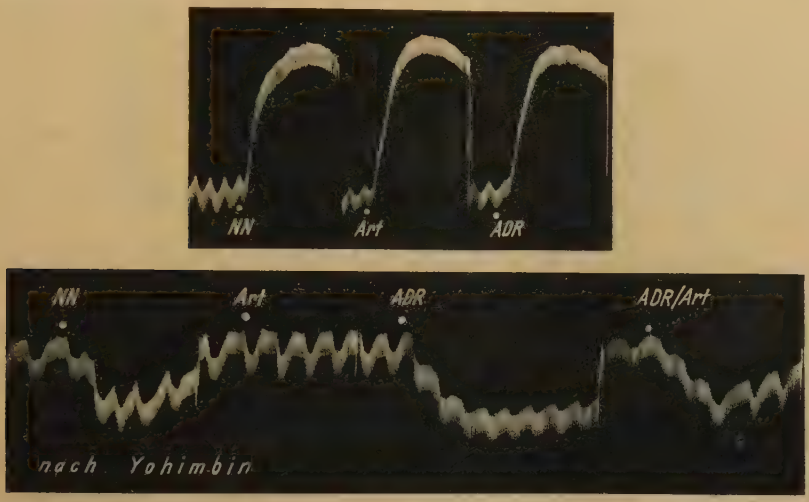


Abb. 4. Nebennierenextrakt — Arterenol — Adrenalin. Beeinflussung der pressorischen Wirkung durch Yohimbin.
Katze 3,2 kg. Blutdruckmessung in Pernoctonnarkose. *NN* 0,2 ccm Nebennierenextrakt (Schwein); *Art* 10 γ Arterenol; *ADR* 10 γ Adrenalin; *ADR/Art* 5 γ Adrenalin + 5 γ Arterenol.

Die am Katzenblutdruck mit einer bestimmten Dosis Adrenalin äquivalente Menge Nebennierenextrakt erfährt durch *Yohimbin* eine weit schwächere Umkehr der pressorischen Wirkung als das reine Adrenalin (Abb. 4). Während *Adrenalin* jetzt einen steilen und lang dauernden Blutdruckabfall veranlaßt (*ADR*), kommt es nach der Injektion des *Nebennierenextraktes* zu einer weit weniger starken Drucksenkung, deren schnelle Rückkehr zum Ausgangsniveau des Blutdrucks durch die antagonistische, also trotz Yohimbin pressorische Wirkung einer zweiten Substanz direkt verursacht zu sein scheint (*NN*). Diese antagonistische Substanz könnte *Arterenol* sein, dessen pressorische Wirkung, wie die Abb. 3B zeigt, nach Yohimbin, wenn auch abgeschwächt, bestehen bleibt. Die Wirkung des Extraktes ist derjenigen eines Adrenalin-Arterenolgemisches vergleichbar (*ADR/Art*). Das Ergebnis des Versuchs spricht somit dafür, daß im Nebennierenextrakt ein Gemisch von Adrenalin und Arterenol vorliegt.

[7] FROWEIN, B.: Biochem. Z. **134**, 558 (1923).

die Nebennieren demnach Depotorgan und vielleicht auch Produktionsstätte für die beiden Sympathine I und E sind. Der Einwand, die modifizierte Adrenalinwirkung der Nebennierenextrakte beruhe auf einer Beimengung von Wirkstoffen der Rinde, müßte allerdings noch entkräftet werden. In jedem Fall wird der *Erregungszustand des sympathischen Nervensystems* von entscheidender Bedeutung sein für die Sympathinmengen, die an den Nervenendigungen oder in den Nebennieren zur Sekretion oder Ausschüttung ins Blut gelangen, sowie für den Anteil, der von den Nieren ausgeschieden wird und sich dann im Harn findet.

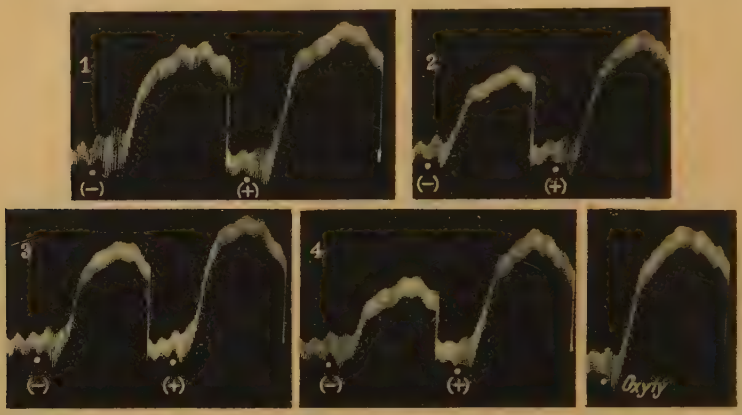


Abb. 5. Ausscheidung von „Urosympathin" nach Arbeitsleistung. Katzenblutdruck. Intravenöse Injektion von 1 ccm Harneluat.
Versuchspersonen: 1. F. D. 23 J.; 2. K. C. 31 J.; 3. P. H. 42 J.; 4. L. W. 21 J.
(—) Vor Arbeitsleistung; (+) nach Arbeitsleistung. *Oxyty* 200 γ Oxytyramin.

Wir haben untersucht, ob die während *erhöhter körperlicher Beanspruchung* zu erwartende vermehrte Ausschüttung in einem erhöhten Gehalt des Harns an Urosympathin zum Ausdruck kommt. Versuchspersonen waren meistens Studenten. An zwei aufeinanderfolgenden Tagen wurde der während der gleichen Zeitspanne, im allgemeinen von 8—14 Uhr sezernierte Harn gesammelt, nach der obenbeschriebenen Methode aufgearbeitet und im Blutdruckversuch an der Katze ausgewertet. An einem der beiden Tage wurde in den beiden ersten Stunden der Versuchsperiode intensiv Sport getrieben: Handball, Kugelstoßen, Weitsprung, Dauerlauf. Ob der erste Versuchstag „Arbeitstag" und der zweite „Ruhetag" war, oder umgekehrt, hatte auf das Resultat keinen Einfluß.

Das Ergebnis eines solchen Versuchs mit 4 Versuchspersonen zeigt die Abb. 5. In allen Fällen kommt es im Anschluß an die körperliche Betätigung zu einer mehr oder weniger deutlichen *Mehrausscheidung von Urosympathin*. Die Versuchsperson 1 (D.) war sportlich gut trainiert, die Versuchsperson 4 (L. W.) war vollkommen untrainiert und hatte am folgenden Tag einen ausgesprochenen Muskelkater. Hier finden sich die größten

Unterschiede zwischen „Ruhe-" und „Arbeitssekretion". In kürzerfristigen Versuchen, in denen sich am *gleichen* Tag z. B. an eine zweistündige Ruheperiode eine ebensolange Arbeitsperiode anschloß, und der während der entsprechenden Zeitperiode sezernierte Harn verarbeitet wurde, oder bei noch anderer Versuchsanordnung, — 24 Stunden „Ruhetag", 24 Stunden „Arbeitstag" mit mehrstündigem Sport — ergaben sich keine deutlichen Unterschiede. Im letzten Fall, in dem wie in den Versuchen des ersten Abschnittes ein aliquoter Teil des in 24 Stunden ausgeschiedenen Harns zur Aufarbeitung kam, fielen auch die in den 6 Stundenversuchen bei den einzelnen Versuchspersonen in Erscheinung tretenden Unterschiede der *Ruhesekretionswerte* fort.

Essentielle Hypertonie und Urosympathingehalt des Harns.

Der von klinischer Seite, insbesondere von Volhard[8] vorgenommenen Differenzierung zwischen „*blassem*", renal bedingtem und „*rotem*" oder essentiellem Hochdruck als einem Sammelbegriff für solche Hypertonieformen, bei denen sich keine Anhaltspunkte für die Annahme einer Erkrankung der *Nieren* als auslösender Ursache finden, liegt die Vorstellung zugrunde, daß nur die renale Hypertonie auf einem „humoralen", „hämatogenen" Mechanismus beruhe, indem es zur Abgabe vasopressorischer Substanzen aus der kranken Niere ans Blut komme. Dieser Vorstellung schienen Untersuchungsergebnisse von Bohn[9] aus der Volhardschen Klinik zu entsprechen, nach denen sich nur bei Fällen *nephrogenen* Hochdrucks, nicht aber bei *essentieller* Hypertonie blutdrucksteigernde Stoffe im Blut fanden, und die somit geeignet gewesen wären, der *klinischen* bzw. *pathologisch-anatomischen* Abgrenzung von blassem und rotem Hochdruck die *pharmakologische* Differenzierung an die Seite zu stellen. Abgesehen davon, daß diese Resultate von den meisten Nachuntersuchern nicht bestätigt werden konnten, häufen sich in den letzten Jahren experimentelle Befunde, die für das Auftreten vasopressorischer Substanzen im Blute auch in solchen Fällen von Hypertonie sprechen, bei denen eine Mitbeteiligung der Niere nicht anzunehmen ist. Hier kann z. B. auf Arbeiten von Kahlson und Werz[10] und von Konschegg[11], sowie auf später veröffentlichte Untersuchungen von Hanschmann[12] und von Vogt[13] verwiesen werden, in denen der Nachweis vasoconstrictorischer Stoffe im Blut von Patienten mit essentieller Hypertonie am Gefäßpräparat des Kaninchenohrs geführt wird. Auch beim

[8] Volhard, F.: G. v. Bergmann und R. Staehelin, Handbuch der inneren Medizin. Bd. 6. 1932. — Nierenkrankheiten und Blutdruck. Leipzig: Johann Ambrosius Barth 1942. — Dtsch. med. Wschr. **1940 I**, 426 u. 452. — [9] Bohn, H.: Z. klin. Med. **119**, 100 (1931); **127**, 232 (1934). — [10] Kahlson, G. u. R. v. Werz: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **148**, 173 (1930). — [11] Konschegg, Th.: Z. exper. Med. **81**, 559 (1932). — Wien. klin. Wschr. **1935 II**, 1250. — [12] Hantschmann, L.: Z. exper. Med. **96**, 442 (1935). — Erg. inn. Med. **49**, 311 (1935). — Klin. Wschr. **1941**, 394. — [13] Vogt, H.: Klin. Wschr. **1938 II**, 1148.

Kaolinhochdruck des Hundes, der sich nach Dixon und Heller[14] durch Injektion einer Kaolinaufschwemmung in die Cisterna cerebello-medullaris erzeugen läßt und mit einer durch Hemmung der Liquorresorption verursachten Erhöhung des intrakraniellen Druckes verbunden ist, ohne daß eine Mitbeteiligung der Niere morphologisch oder funktionell sich bemerkbar machte, gewinnt das Blut pressorische Eigenschaften, indem es, wie Pick[15] zeigte, an normalen Hunden bei Transfusion Blutdrucksteigerung hervorruft, und nach Vogt[13] ähnlich wie das Blut bei der essentiellen Hypertonie des Menschen, am Kaninchenohr gefäßverengernd wirkt.

Die häufige Kombination von essentieller Hypertonie mit Störungen der *Hypophysenfunktion*, die sich anscheinend in Form einer Überproduktion corticotroper und adrenalotroper Vorderlappenhormone auszuwirken vermögen[16], das manchmal zu beobachtende zeitliche Zusammenfallen der Entstehung mit einer Involution der *Sexualdrüsen*, das besonders von Kylin[17] im Sinne eines ursächlichen Zusammenhanges gedeutet wird; und schließlich das nicht seltene gleichzeitige Bestehen einer *diabetischen* Stoffwechselstörung[18] rückt die Bedeutung *endokriner* Faktoren für die Pathogenese ins Gesichtsfeld und macht verständlich, daß auch hier mit einem „humoralen", „hämatogenen" Mechanismus zu rechnen ist. In die gleiche Richtung weist die Vorstellung, daß neben endokrinen Faktoren und vielleicht durch sie bedingt, eine allgemeine zentrale vasomotorische Übererregbarkeit, ein *erhöhter Vasomotoren-* und *Sympathicotonus* von entscheidender Bedeutung ist[19]. Unter diesen Umständen würde eine humorale Übertragung der Nervenerregungen in erhöhtem Maße mit dem Freiwerden von Überträgerstoffen verknüpft sein müssen, die als adrenalinähnliche Sympathine an den Nervenendigungen oder auch in den Nebennieren zur Ausschüttung kämen und auf diese Weise die vasopressorische Wirksamkeit des Blutes auch bei essentieller Hypertonie zu erklären vermöchten.

Für die „*Sympathinnatur*" der Pressorsubstanz der essentiellen Hypertonie sprechen mehrere Befunde. Einmal läßt sich nach Vogt[13] der „Kaolinhochdruck" am Hund nicht mehr erzeugen, wenn vorher die *Nebennieren* entfernt wurden. Nach einem neueren Bericht von Schroeder und Adams[20] hatte die Behandlung mit intravenösen Injektionen gereinigter *Polyphenoloxydasepräparate* bei einer größeren Anzahl von Patienten mit essentieller Hypertonie einen guten therapeutischen Erfolg, indem der pathologisch erhöhte Blutdruck gesenkt wurde. In die gleiche Richtung weist die von

[14] Dixon, W. E. u. H. Heller: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **166**, 265 (1932). — [15] Pick, E. P.: Wien. klin. Wschr. **1935 I**, 635. — [16] Jores, A.: Klin. Wschr. **1936 I**, 841. — [17] Kylin, E.: Klin. Wschr. **1935 I**, 470. — Der Blutdruck des Menschen. Dresden 1937. — [18] Hantschmann, L.: Klin. Wschr. **1941**, 394. — [19] Übersichten bei Kahler: Erg. inn. Med. **25**, 265 (1924). — Raab: Erg. inn. Med. **46**, 452 (1934). — Kylin: Die Hypertoniekrankheiten. Berlin 1930. — [20] Schroeder, H. A. u. M. H. Adams: Praxis **1941**, 647, zit. nach Mercks Jber. **56**, 164 (1942). — J. exper. Med. (Am.) **73**, 531 (1940).

klinischer Seite erprobte und empfohlene Behandlung der essentiellen Hypertonie mit *Yohimbin*, wenn man in Analogie zu der Beeinflussung der Urosympathinwirkung durch Yohimbin in unseren Blutdruckversuchen an der Katze die therapeutische Wirkung des Alkaloids im Sinne einer Abschwächungs- oder Umkehrwirkung auf den blutdrucksteigernden Effekt sympathischer Erregungen deuten würde. Eine weitere Stütze für die Auffassung von der Sympathinnatur des pressorischen Stoffes geben schließlich die nun folgenden eigenen Untersuchungen, die zeigen, daß in manchen

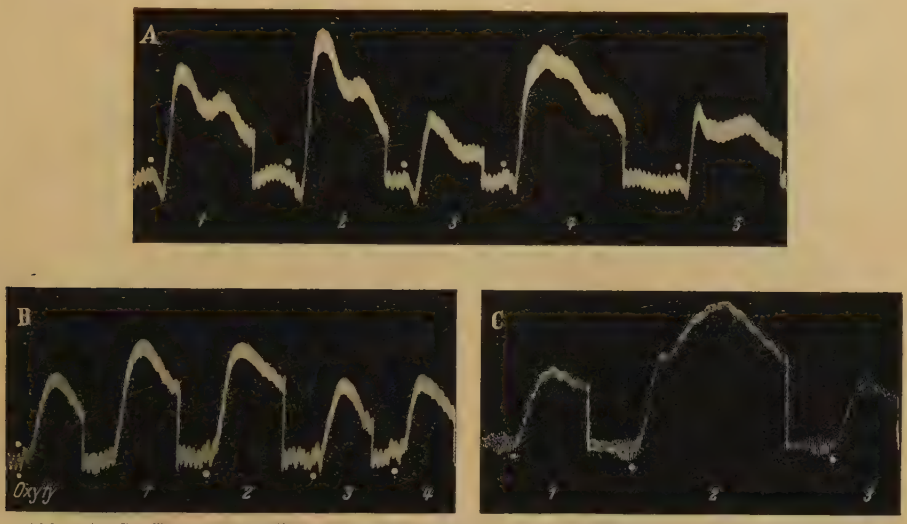


Abb. 6 A—C. „Urosympathin"gehalt des Harns bei essentieller Hypertonie. Blutdruckversuche an Katzen in Pernoctonnarkose. — Intravenöse Injektion von Harneluaten.
A Katze, 2,8 kg. Injektion von je 1 ccm Harneluat. 1. W. K. **, 56 J. Essent. Hypertonie. RR 200/120. 2. K. Z. **, 47 J. Essent. Hypertonie, Diabetes. RR 180/100. 3. K. C. **, 31 J. gesund. RR 110/85. 4. P. F. **, 64 J. Essent. Hypertonie RR 250/165. 5. P. H. **, 42 J. gesund. RR 110/85. B. Katze, 3,5 kg. Injektion von je 1,5 ccm Harneluat. *Oxyty* 100 γ Oxytyramin. 1. E. T. **, 36 J. leichter Basedow. RR 150/95. 2. R. P. **, 55 J. Essent. Hypertonie RR 210/130. 3. F. L. **, 28 J. ulcus duodeni RR 100/75. 4. A. S. **, 50 J. gesund. RR 125/90. C. Katze, 2,5 kg. Injektion von je 1 ccm Harneluat. 1. L. D. **, 64 J. gesund RR 130/90. 2. H. R. **, 58 J. Essent. Hypertonie RR 220/130. 3. G. H. **, 19 J. gesund.

Fällen essentieller Hypertonie der Gehalt des Harns an *Urosympathin* stark erhöht ist.

Methodik. Die Harne wurden nach der gleichen Methode wie in den Versuchen des ersten Abschnittes aufgearbeitet. Wie dort kam jeweils $^1/_5$ der 24-Stundenmenge zur Aufarbeitung. *6 ccm Eluat* entsprachen $^1/_5$ *der Tagesmenge.*

Die Abb. 6 gibt einige Beispiele für den positiven Ausfall von Versuchen an insgesamt 23 Patienten mit *essentieller Hypertonie.* In 16 Fällen wurden ähnlich deutliche Unterschiede der pressorischen Wirksamkeit von Normalharn und Harn bei essentieller Hypertonie gefunden wie sie in den abgebildeten Kurven zum Ausdruck kommen. In 7 Fällen war der Hypertonikerharn nicht nennenswert wirksamer als die Vergleichsharne

Blutdrucknormaler. In 2 von 3 *Basedowfällen* mit leicht erhöhtem Blutdruck waren die Harne pressorisch wirksamer als Normalharn, in 5 Fällen von *Eklamsie* fand sich keine erhöhte Wirksamkeit. Der höheren Blutdruckwirksamkeit des Hypertonikerharns entspricht eine stärkere Lähmungswirkung am isolierten Darm: *blutdrucksteigernde* und *darmlähmende* Wirkung gehen parallel (Abb. 7). Wie das sympathicomimetische Prinzip des normalen Harns, so wird auch die wirksame Substanz des Hypertonikerharns im Blutdruckversuch an der Katze durch Cocain sensibilisiert; Polyphenoloxydase vernichtet die Wirkung. Auch das bei Hypertonie vermehrt ausgeschiedene Harnsympathin liegt zum Teil in *gebundener*

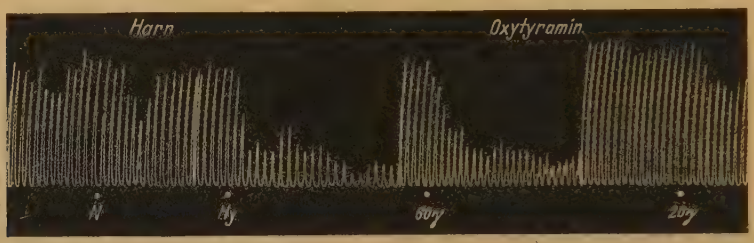


Abb. 7. Darmlähmende Wirkung des Harns bei essentieller Hypertonie. Kaninchendünndarm in 20 ccm Tyrode, 37 °. — Harneluate. *N* 0,2 ccm Normalharn; *Hy* 0,2 ccm Hypertonikerharn; 60 γ = 60 γ Oxytyramin; 20 γ = 20 γ Oxytyramin.

unwirksamer Form vor, so daß die *hydrolysierten* Versuchsansätze unseren früheren Beobachtungen[1] entsprechend wirksamer sind.

Ähnlich wie es bei gesunden Menschen mit normalem Blutdruck *nach Arbeitsleistung* zu einer vermehrten Bildung und Ausscheidung von Urosympathin kommt, findet sich bei Patienten mit essentieller Hypertonie schon *in der Ruhe* häufig ein deutlich über die Norm erhöhter Urosympathingehalt des Harns, dem wohl auch in diesem Falle eine gesteigerte Produktion der sympathicomimetischen Komponenten entspricht. Auswertungsversuche ergaben, daß die pressorische Wirksamkeit des 24-Stundenharns, die bei *normalem Blutdruck* 2—3 mg Oxytyramin äquivalent ist, bei *essentieller Hypertonie* der Wirksamkeit von 5—8 mg Oxytyramin entsprechen kann.

Bemerkungen zu den Versuchsergebnissen.

1. Die *Methode*, die in der vorliegenden Arbeit den Nachweis des Urosympathins im normalen Harn und seiner vermehrten Ausscheidung nach Arbeitsleistung sowie in Fällen essentieller Hypertonie ermöglichte, ist weitgehend spezifisch für die Isolierung von *Polyphenolderivaten*. Sie wurde von uns zuerst mit Erfolg bei dem Versuch angewandt, das nach Dopabelastung im Harn auftretende Oxytyramin zu isolieren und nachzuweisen[1]. Die Polyphenole werden als Bleisalze gefällt und anschließend durch Adsorption an Aluminiumhydroxyd angereichert. Ein wesentlicher Schritt bei der

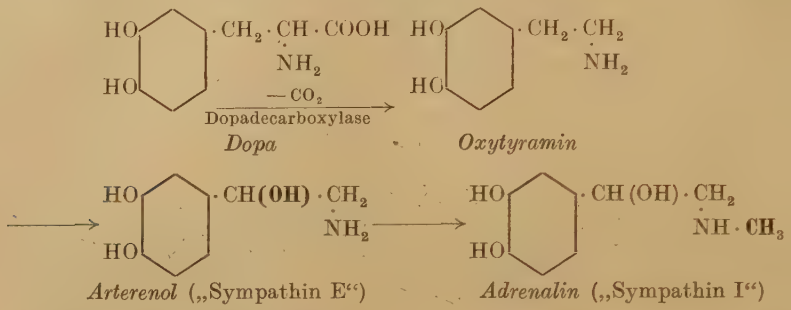
Aufarbeitung ist die *hydrolytische Aufspaltung* der zum größten Teil in gepaarter, pharmakologisch unwirksamer Form ausgeschiedenen Urosympathinkomponenten, da hierdurch meistens überhaupt erst ihr biologischer Nachweis möglich wird. Bei den zahlreichen Versuchen anderer Autoren zur Auffindung blutdrucksteigernder Substanzen im Harn, die es in Unkenntnis dieser Verhältnisse unterließen, in den Gang der Aufarbeitung eine Säurehydrolyse einzuschalten, mußte deshalb der größte Teil der pressorischen Polyphenole, nämlich der biologisch unwirksame, gepaarte Anteil dem Nachweis entgehen. Berücksichtigt man ferner, daß in den bisherigen Untersuchungen wohl wegen des Fehlens begründeter Vorstellungen über die *Natur* der zu isolierenden und nachzuweisenden Substanz die Aufarbeitung des Harns mit *unspezifischen* Methoden erfolgte — wie z. B. in den Versuchen von Abelous und Bardier[21] und später von Bohn[22], sowie von Coester[23] und in neuester Zeit von Simon[24] durch Herstellung von Alkohol- oder Acetonextrakten mit eventuell vorgeschalteter Adsorption an Tierkohle, wobei dann neben *pressorischen* auch *depressorische* Harnbestandteile, beispielsweise Histamin miterfaßt werden —, so wird verständlich, daß die Ergebnisse solcher Untersuchungen nicht reproduzierbar sind und sich einander widersprechen. Demgegenüber ist es mit Hilfe der von uns benutzten Methode möglich, regelmäßig und mit Sicherheit in jedem menschlichen Harn pressorische Substanzen nachzuweisen.

2. Die experimentellen Befunde unserer Arbeit haben es wahrscheinlich gemacht, daß das „*Urosympathin*" des normalen Harns, das bei Arbeitsleistung und bei essentieller Hypertonie vermehrt gebildet und ausgeschieden wird, sich aus *Oxytyramin*, *Arterenol* und *Adrenalin* zusammensetzt. Wir haben auf die Untersuchungen amerikanischer Forscher[4] über Sympathin E und Sympathin I hingewiesen, die für eine Funktion von Arterenol und Adrenalin als Überträgerstoffe sympathischer Nervenerregungen sprechen, und aus denen sich eine Übereinstimmung im pharmakologischen Verhalten von Sympathin E und Arterenol ergibt[5].

Cannon[25] hat gegen die Identifizierung seines Sympathins E mit Arterenol den Einwand erhoben, es stehe im Widerspruch zur *Ökonomie des Stoffwechselgeschehens*, wenn bei der Entstehung lebenswichtiger Wirkstoffe die konstitutionell primitivere Stufe — *Arterenol* — sich aus der höheren Stufe — *Adrenalin* — durch Abbau, in diesem Fall durch Entmethylierung bilde. Die nebenstehend formulierten Reaktionen, aus denen die *genetischen Beziehungen* zu ersehen sind, und die dem fermentativen Bildungsweg der drei Urosympathinkomponenten im intermediären Stoffwechsel entsprechen

[21] Abelous, J. E. and E. Bardier: J. Physiol. et Path. gén. **11**, 34, 377 (1909). — [22] Bohn, H. u. F. Hahn: Z. klin. Med. **123**, 558 (1933). — [23] Coester, C.: Z. klin. Med. **128**, 656, 665 (1935). — [24] Simon, A. u. E. Gyulai: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **203**, 171 (1944). — [25] Cannon, W. B. u. A. Rosenblueth: Amer. J. Physiol. **113**, 251 (1935).

dürften, beseitigen diesen Einwand, indem sie — im Einklang mit der „Ökonomie" des Stoffwechsels — das Sympathin E oder Arterenol nicht durch *Abbau* aus einer *höheren*, sondern durch *Aufbau* aus einer *niedrigeren* Stufe, nämlich aus Oxytyramin entstehen lassen.



Die *Dopadecarboxylase* nimmt eine Schlüsselstellung ein, indem sie aus inertem Rohmaterial, der Aminosäure Dopa, das erste pharmakologisch wirksame Ausgangsprodukt, Oxytyramin, macht. Aus der Muttersubstanz Oxytyramin bildet sich — vielleicht im Nebennierenmark, vielleicht auch nur im Bereich sympathischer Nervenendigungen — durch Einführung einer OH-Gruppe in die Seitenkette der erste Sympathicusstoff: *Sympathin E, Arterenol*; aus diesem entsteht durch Methylierung der zweite Sympathicusstoff: *Sympathin I, Adrenalin.*

3. Wir haben Gründe für die *Sympathinnatur* des Pressorstoffes der essentiellen Hypertonie angeführt. Einer dieser Gründe war die über die Norm erhöhte Ausscheidung von „Urosympathin" bei Patienten mit arteriellem Hochdruck. Voraussetzung war hierbei, daß das vermehrt *ausgeschiedene* pressorische Prinzip — ein Gemisch von Oxytyramin, Arterenol und Adrenalin — in erhöhtem Maße *gebildet* würde und vor der Ausscheidung in erhöhter Konzentration im Blut kreiste. Die Annahme, daß eine in den *Harn* ausgeschiedene Substanz sich vorher *als solche* im *Blute* befindet, ist jedoch ohne weitere experimentelle Belege nicht berechtigt, da der im Blut gelöste Stoff während der Passage durch die Niere wesentliche Veränderungen erfahren kann. Es müßte der Nachweis eines bei essentieller Hypertonie höheren Gehaltes des Blutes an „Urosympathin" gefordert werden.

Die schon erwähnten und, soweit wir sehen, einzigen überzeugenden und reproduzierbaren Versuche zum Nachweis vasopressorischer Stoffe im *Blut* von Patienten mit essentieller Hypertonie hatten das Ergebnis, daß Blut und Plasma in diesen Fällen bei Transfusion größerer Mengen blutdrucksteigernd und am Gefäßpräparat des Kaninchenohrs stärker als Normalblut konstriktorisch wirken. Die bei essentieller Hypertonie vermehrt auftretende vasokonstriktorische Substanz des Blutes kann aber mit Adrenalin ebensowenig wie mit Arterenol und Oxytyramin, den beiden

anderen Komponenten des Urosympathins, identisch sein, da ihre Wirkung auch am *ergotoxinvergifteten* Präparat ohne Abschwächung erhalten bleibt[10, 12, 13].

Ob genetische Beziehungen, wie wir sie für die drei Urosympathinkomponenten dargelegt haben, sich bis zu der unbekannten vasopressorischen Substanz des Blutes erstrecken und damit auch das bei *essentieller Hypertonie* im Blute vermehrt gefundene „Constriktin" umfassen, müßte die Fragestellung weiterer Untersuchungen sein. Auf etwa bestehende Zusammenhänge dieser Art wird noch einmal in der folgenden Arbeit[26] eingegangen.

Zusammenfassung.

1. Mit einer für die Isolierung von *Polyphenolderivaten* spezifischen Methode gelingt es, in jedem menschlichen Harn pressorische Substanzen nachzuweisen. Die blutdruckwirksamen Stoffe wirken darmlähmend, ihre Wirkung wird durch *Cocain* verstärkt, durch *Ergotoxin* oder *Yohimbin* abgeschwächt bzw. umgekehrt und durch *Polyphenoloxydase* unter Braunfärbung zerstört.

2. Aus Versuchen an verschiedenen biologischen Testobjekten geht hervor, daß die so erfaßbare pharmakologische Wirksamkeit des Harns wahrscheinlich auf dem Vorhandensein eines Gemisches von *Oxytyramin*, *Adrenalin* und *Arterenol* beruht („Urosympathin"). Es wird auf die genetischen Beziehungen zwischen den drei Aminen und auf ihre Bedeutung als Überträgerstoffe sympathischer Nervenerregungen hingewiesen.

3. Einige orientierende Versuche mit *Nebennierenextrakten* lassen es als möglich erscheinen, daß die Nebennieren außer Adrenalin (Sympathin I) auch Arterenol (Sympathin E) enthalten.

4. Die in 24 Stunden ausgeschiedenen *Urosympathinmengen* sind am Katzenblutdruck äquivalent mit 2—3 mg Oxytyramin bzw. 100—150 γ Adrenalin oder Arterenol.

5. Die Ausscheidung von Urosympathin ist nach *Arbeitsleistung* und in manchen Fällen *essentieller Hypertonie* vermehrt; sie kann Werte bis zu 8 mg Oxytyramin in 24 Stunden erreichen. Es ist anzunehmen, daß der vermehrten Ausscheidung eine erhöhte Produktion entspricht.

6. Die Gründe, die für die „*Sympathinnatur*" des Pressorstoffes der essentiellen Hypertonie sprechen, werden erörtert.

[26] Holtz, P. u. K. Credner: Naunyn-Schmiedebergs Arch. (im Druck).

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut (Prof. Dr. med. P. Holtz) und dem Pharmakologischen Institut (i. V. Prof. Dr. P. Holtz) der Universität Rostock.

Dopadecarboxylase, Renin und renale Hypertonie *.

Von

Peter Holtz und Karl Credner.

Unter Mitarbeit von Fritz Drenkhahn, Günther Kroneberg und Esther Künzelmann.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. Januar 1945.)

Die klinisch und pathologisch-anatomisch begründete Differenzierung zwischen „blassem", renal bedingtem und „rotem" Blutdruck[1], an dessen Entstehung die Niere nicht ursächlich beteiligt sein soll, hat nicht nur die experimentelle Hypertonieforschung befruchtet, sondern auch ihrerseits durch die Forschungsergebnisse des letzten Jahrzehnts eine feste experimentelle Fundierung erhalten. Während unsere Vorstellungen vom Mechanismus der *essentiellen* Hypertonie, des „roten" Hochdrucks noch wenig einheitlich sind, und es fraglich ist, ob das menschliche Krankheitsbild zu bestimmten Formen des experimentellen Hochdrucks, z. B. dem „Entzügelungshochdruck"[2] oder dem „Kaolinhochdruck"[3] am Hund in Parallele gesetzt werden darf, konnte der Mechanismus der *renalen* Hypertonie im Tierexperiment weitgehend geklärt werden. Der nephrogene Hochdruck des Menschen findet in mancher Beziehung sein Analogen im „Drosselungshochdruck" des Hundes. Mit der vor allem von Goldblatt[4] in Amerika entwickelten Technik gelingt es, am Tier durch Drosselung der Nierenarterie chronische Blutdrucksteigerungen hervorzurufen, die in ihrem Verhalten und in ihrer Auswirkung mit bestimmten Fällen renaler Hypertonie

* Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden im September 1942 während eines durch die Zeitverhältnisse bedingten mehrmonatigen Aufenthaltes in Greifswald begonnen und in Rostock fortgesetzt und zu Ende geführt. Herrn Prof. Wels danken wir für die uns freundlichst gegebene Arbeitsmöglichkeit im Greifswalder Pharmakologischen Institut, Herrn Prof. Katsch und Herrn Prof. Schilling, den Direktoren der Greifswalder bzw. Rostocker Medizinischen Klinik, für die Zuweisung geeigneter Patienten.

[1] Volhard, F.: G. v. Bergmanns und R. Staehelins Handbuch der inneren Medizin, Bd. 6. 1932. — Nierenkrankheiten und Blutdruck. Leipzig: Johann Ambrosius Barth (1942). — Dtsch. med. Wschr. **1940 I**, 426, 452. — [2] Koch, E.: Monographien Kreisl.forsch. **1** (1931). — [3] Dixon, W. E. u. H. Heller: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **166**, 265 (1932). — [4] Goldblatt, H. u. Mitarb.: J. exper. Med. (Am.) **59**, 347 (1934); **65**, 233 u. 671 (1937); **67**, 809 (1938).

am Menschen vergleichbar sind. Die verminderte Durchblutung der Niere, die *Ischämie* des Nierengewebes, in der VOLHARD[1] den wichtigsten Faktor für die Entstehung der *menschlichen* Erkrankung erblickt, wird damit auch bei der experimentellen Erzeugung des Drosselungshochdrucks *am Tier* zur auslösenden Ursache.

Man nimmt an, daß die ischämische Niere bei möglicherweise voll erhaltener *exkretorischer* Funktion sozusagen *innersekretorische* Fähigkeiten gewinnt und durch Abgabe vasopressorischer Stoffe ans Blut das Ansteigen des arteriellen Drucks veranlaßt. Die Annahme eines solcherart humoralen, hämatogenen Mechanismus kann sich auf eine größere Zahl von Untersuchungen[5] stützen, aus denen hervorgeht, daß es auch nach vollständiger Sympathektomie und nach Entnervung der Niere, ja selbst bei Transplantation des ischämischen Organs in den Nacken des Versuchstiers zur Entwicklung eines Hochdrucks kommt. Die engeren Beziehungen aber zwischen Ischämie des Gewebes und innerer Sekretion des Organs bei experimentellem Drosselungshochdruck und bei der renalen Hypertonie des Menschen sind noch nicht geklärt, die Frage nach dem eigentlichen und feineren chemischen Mechanismus der „vasopressorischen Sekretion" und nach der Natur der ins Blut sezernierten blutdrucksteigernden Stoffe ist unbeantwortet. Im folgenden wird versucht, auf diese Fragen eine Antwort zu finden durch die *Erörterung* und *Erforschung* von Mechanismen, die an der Bildung und Sekretion vasopressorischer Substanzen durch die ischämische Niere beteiligt sein könnten.

Es ist anzunehmen, daß die Ischämie entscheidenden Einfluß auf die *Stoffwechselvorgänge* im Gewebe ausübt, und daß es deshalb *fermentative Reaktionen* sein werden, auf die vor allem das Augenmerk zu richten ist. Es liegt nahe, zunächst solche Fermentreaktionen ins Auge zu fassen, von denen bekannt ist, daß ihr ungestörter Ablauf durch einen mit der Ischämie zwangsläufig verknüpften Faktor — die mangelhafte Sauerstoffversorgung — maßgeblich beeinträchtigt wird.

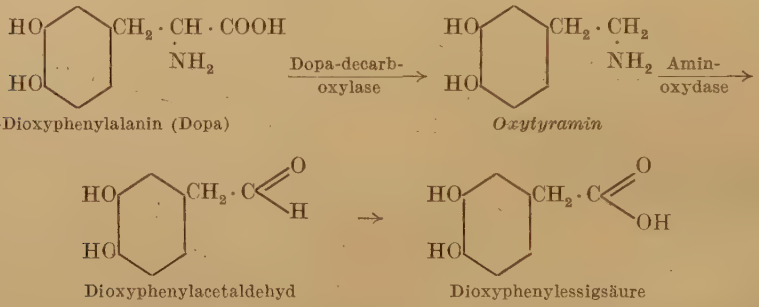
Dopadecarboxylase.

Vor mehreren Jahren haben wir[6] in der Nierenrinde des Menschen und aller untersuchten Säugetiere ein Ferment nachgewiesen, das die natürliche Aminosäure l-Dioxyphenylalanin (Dopa) zu dem blutdrucksteigernden, adrenalinähnlichen Oxytyramin decarboxyliert. Unsere Ergebnisse sind in der Zwischenzeit von BING[7] und von BLASCHKO[8] bestätigt worden.

[5] PAGE, J. H.: Amer. J. Physiol. **112**, 166 (1935). — COLLINS, D. A.: Amer. J. Physiol. **116**, 616 (1936). — FREEMAN, N. E. u. I. H. PAGE: Amer. Heart J. **14**, 105 (1937). — VERNEY, E. B. u. M. VOGT: Quart. J. exper. Physiol. **28**, 253 (1938). — HOUSSAY, B. A. u. Mitarb.: J. Physiol. (Brit.) **94**, 281 (1938). — [6] HOLTZ, P. u. R. HEISE: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **191**, 87 (1938). — HOLTZ, P.: Erg. Physiol. **44**, 230 (1941). — [7] BING, R. J.: Amer. J. Physiol. **132**, 497 (1941). — [8] BLASCHKO, H.: J. Physiol. (Brit.) **96**, 50 P (1939); **101**, 337 (1942/43).

Die *Froschniere* erwie sich in unseren Versuchen als frei von Dopadecarboxylase. Aus Untersuchungen von VOGT[9] am Institut von VERNEY geht hervor, daß sich im Gegensatz zum Säugetier beim *Frosch* durch Drosselung der Nierendurchblutung kein arterieller Hochdruck erzeugen läßt.

Dopadecarboxylase-Aminoxydase. Bei guter Sauerstoffversorgung läßt sich in Versuchsansätzen aus Nierenextrakt und Dopa kein Oxytyramin nachweisen[6]. Unter diesen Umständen wird das auch jetzt entstehende Amin durch ein zweites Ferment der Niere, die *Aminoxydase*, über die Zwischenstufe des nicht mehr blutdruck*steigernden*, sondern blutdruck*senkenden* Aldehyds zur unwirksamen Säure, der Dioxyphenylessigsäure oxydiert. Den der Wirkung der Dopadecarboxylase zugrunde liegenden Beziehungen entspricht das Reaktionsschema.



l-Dioxyphenylalanin (Dopa) — *Oxytyramin*

Dioxyphenylacetaldehyd — Dioxyphenylessigsäure

Aus Versuchen von KOHN[10] mit einem dem Oxytyramin nahestehenden Amin, dem Tyramin, ergibt sich, daß bei der Aminoxydase der Niere in weit ausgeprägterem Maße als bei anderen Oxydationsfermenten die *Geschwindigkeit* der Fermentwirkung vom Partialdruck des Sauerstoffs abhängt, so daß dieser direkt zum „limiting factor" der Fermentreaktion werden kann. Eine Übertragung auf die Verhältnisse des lebenden Organismus würde zu der Vorstellung führen, daß es bei mangelhafter Durchblutung und Sauerstoffversorgung der Niere zu einer verminderten Zerstörung und dadurch zu einer erhöhten Abgabe von Oxytyramin ans Blut käme.

Man könnte, wie wir das früher auch schon getan haben[11], einwenden, daß die Aminoxydase nicht nur in der Niere, sondern auch in anderen Organen z. B. in der Leber vorkomme, und ihre Wirkung hier durch Sauerstoffmangel in der Niere natürlich nicht beeinträchtigt werde, so daß selbst bei vollkommener funktioneller Ausschaltung des Nierenfermentes eine oxydative Zerstörung genügenden Umfanges gewährleistet sei. Dem wäre

[9] VOGT, MARTHE: Quart. J. exper. Physiol. **30**, 341 (1940). — [10] KOHN, H. J.: Biochem. J. (Brit.) **31**, 1693 (1937). — [11] HOLTZ, P. u. K. CREDNER: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **200**, 356 (1942).

entgegenzuhalten, daß einem *nachträglichen* Unschädlichmachen der wirksamen Substanz, nachdem diese von der Niere ins Blut sezerniert wurde und ihre pressorische Wirkung ausübte, vielleicht keine allzugroße Bedeutung zukäme, wenn das in der Niere als der Hauptproduktionsstätte bestehende physiologische Gleichgewicht zwischen *Aminbildung* und *Aminzerstörung*, zwischen *Dopadecarboxylase* und *Aminoxydase*, durch Sauerstoffmangel zur Seite der Aminbildung verschoben ist, und demzufolge die einer intravenösen Dauerinfusion vergleichbare Aminabgabe an das Blut der V. renalis unphysiologisch hohe Werte erreicht. Frühere vergleichende Versuche[6] mit Nierenextrakten verschiedener Tierarten hatten zu dem Ergebnis geführt, daß *Decarboxylase* und *Oxydase* der Niere mengenmäßig bzw. funktionell aufeinander abgestimmt zu sein scheinen, so daß unter physiologischen Verhältnissen tatsächlich mit dem Bestehen eines Fermentgleichgewichts zu rechnen wäre, das bei O_2-Mangel in dem oben dargelegten Sinne gestört sein müßte.

*Retention**. Auf einem anderen Wege noch könnte die Ischämie der Niere Ursache einer pathologischen Erhöhung des Blutdrucks werden. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit[11] über die physiologische Bedeutung der Dopadecarboxylase konnten wir zeigen, daß das Ferment auch unter physiologischen Verhältnissen, im lebenden Organismus seine Funktion ausübt, da sich bei Mensch und Tier nach der Belastung mit Dopa Oxytyramin im Harn findet. Es konnte ferner wahrscheinlich gemacht werden, daß der menschliche Harn auch ohne experimentelle Dopabelastung kleine Mengen Oxytyramin enthält, die, vermutlich nicht benötigt für die Adrenalinbildung in der Nebenniere, durch die Niere eliminiert werden. Besonders bemerkenswert ist, daß das „Harnoxytyramin" zum überwiegenden Anteil in gebundener, pharmakologisch unwirksamer Form vorliegt, aus der es durch Säurehydrolyse freigemacht wird. Zum Schutze vor unerwünschten Wirkungen der zur Hormonbildung nicht benutzten Aminmengen steht dem Organismus demnach neben dem Abbau durch *Oxydation* als zweite Möglichkeit die unter Paarung erfolgende *Ausscheidung* zur Verfügung. Es wurde schon früher darauf hingewiesen, daß ein durch Ausscheidungsinsuffizienz der Niere bedingtes Versagen dieses Entgiftungsmechanismus zu einer *Retention* des adrenalinähnlichen Amins und dadurch vielleicht zu einer Blutdrucksteigerung führen müßte.

Wir haben an 14 Patienten mit nephritischem Hochdruck und an 8 nieren- und kreislaufgesunden Vergleichspersonen Belastungsversuche mit Dopa gemacht. Es wurden 50 mg Dopa in 7,5 ccm physiologischer NaCl-Lösung intravenös injiziert und der in den folgenden 2—4 Stunden sezernierte Harn am Katzenblutdruck auf Oxytyramin untersucht. Die Harne wurden in einem Teil der Versuche direkt injiziert, nachdem sie lediglich durch entsprechendes Eindampfen im Vakuum bei leicht

* Experimentell mitbearbeitet von G. Kroneberg.

essigsaurer Reaktion auf gleiches Volumen gebracht und anschließend aliquote Mengen mit Schwefelsäure — 0,25 ccm konz. H_2SO_4 auf 10 ccm Harn, 20 Min. siedendes Wasserbad — hydrolysiert worden waren. In anderen Versuchen wurden sie unter Adsorption und Elution der pressorischen Substanz nach der schon früher angewandten und auf S. 229 beschriebenen Methode aufgearbeitet.

Das übereinstimmende Ergebnis aller Versuche wird in der Abb. 1 an einigen Beispielen erläutert. Bei *nephritischem Hochdruck* enthält der Harn

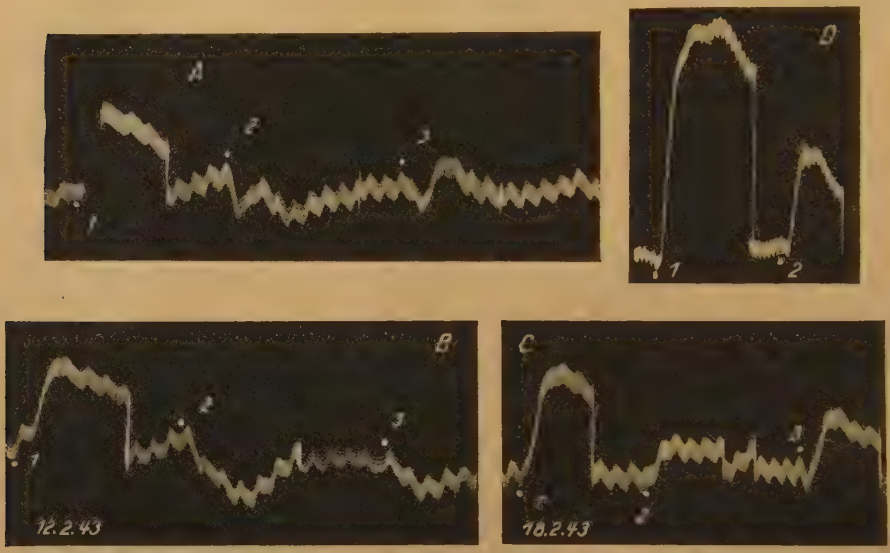


Abb. 1. Oxytyraminausscheidung nach intravenöser Injektion von 50 mg l-Dopa. Katze, 2,7 kg. Pernoctonnarkose. Blutdruck aus der Art. femoral. *A* 2-Stundenharne, 1,5 ccm i.v *1* F. S. ♂, 36 J. nierengesund, RR 115/90. *2* K. M. ♂, 28 J., akute Nephritis, RR160/120. *3* P. F. ♂, 42 J., akute Nephritis, RR 170/130. *B* u. *C* 3-Stundenharne, 1,0 ccm i.v. *B* am 12. 2. 43. — *C* am 18. 2. 43., nach einwöchiger klinischer Behandlung. *1* A. W. ♀, 56 J., nierengesund, RR 135/95. *2* E. B. ♀, 26 J., akute Nephritis, RR 165/120. *3* I. C. ♀, 41 J., akute Nephritis, RR 195/150. *D* 3-Stundenharne. — Adsorbiert/Eluiert (100 ccm Eluat) 0,5 ccm Harneluat i.v. *1* R. T. ♂, 20 J., nierengesund. *2* P. S. ♂, 48 J., akute Nephritis, RR 185/150.

nach intravenöser Injektion von Dopa keine nachweisbaren, in anderen Fällen nur geringe Mengen Oxytyramin, während in Kontrollversuchen an Nierengesunden, wie auf Grund früherer Selbstversuche zu erwarten war, deutlich wirksame Aminkonzentrationen gefunden werden. Daß die verminderte Ausscheidung tatsächlich auf einer *Retention* und nicht etwa auf einer verminderten fermentativen Aminbildung beruht, haben wir dadurch wahrscheinlich zu machen versucht, daß wir den nach Dopabelastung ausgeschiedenen Harn durch Zusatz von Kartoffelpolyphenoloxydase in der WARBURG-Apparatur auf seinen Gehalt an „*Gesamtpolyphenol*" untersuchten. Denn es ist anzunehmen, daß Oxytyramin nicht das einzige Polyphenolderivat ist, welches nach Verabfolgung von Dopa ausgeschieden

wird. Aus den Zahlenwerten der Abb. 2 für den *Sauerstoffverbrauch* der untersuchten Harne ist zu ersehen, daß die bei Nephritis verminderte Ausscheidung von Oxytyramin mit einer allgemeinen Ausscheidungsinsuffizienz für Polyphenole verbunden ist. Das zeigt dann schließlich auch das fast vollkommene Ausbleiben der *Melaninbildung* beim Einwirkenlassen von Polyphenoloxydase auf die in Reagenzgläser abgefüllten Harnproben (Abb. 2). Voraussetzung bei diesen Versuchen ist, daß die Harne nicht schon vor Zusatz von Oxydaseferment starke Eigenfarbe besitzen.

Um eine *Retention* blutdrucksteigernder Substanz handelt es sich deshalb wohl auch in den folgenden Versuchen, in denen bei nephritischem Hochdruck ohne experimentelle Dopabelastung der Harn auf pressorische Wirkung untersucht wurde. Die Aufarbeitung der Harne erfolgte nach der schon früher von uns zum Nachweis und zur Anreicherung der oxytyramin-ähnlichen Substanz des normalen Harns benutzten Methode, die sich an das von SHAW[12] beschriebene Verfahren zum kolorimetrischen Nachweis von Adrenalin und ähnlichen Polyphenolderivaten anlehnt.

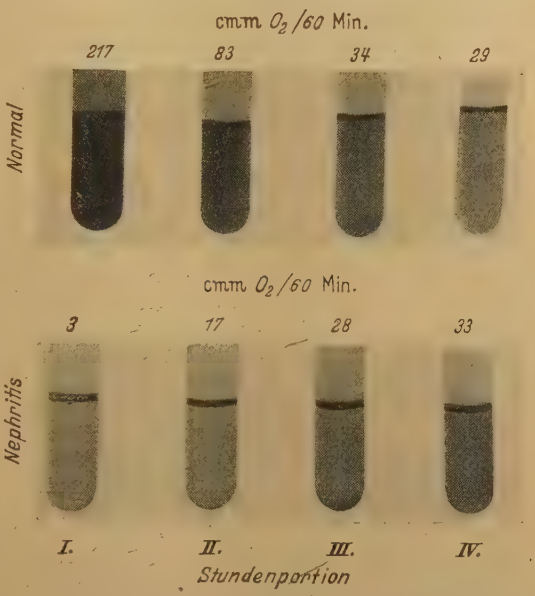


Abb. 2. Sauerstoffaufnahme und Melaninbildung durch Harnpolyphenol nach intravenöser Injektion von l-Dopa. Oben: Nierengesunder. Unten: Akute Nephritis. 50 mg l-Dopa in 7,5 ccm NaCl i.v. Die im Anschluß an die Injektion stündlich sezernierten Harnmengen werden durch Eindampfen im Vakuum bei essigsaurer Reaktion auf gleiches Volumen (20 ccm) gebracht. Zahlen: O_2-Aufnahme (cmm O_2); WARBURG-Apparatur: 2 ccm Harn + 0,5 ccm M/2 Phosphatpuffer, p_H 6,8 + 0,5 ccm Kartoffelsaft (Polyphenoloxydase), 60 Min. bei 37° geschüttelt. — Melaninbildung: Die gleichen Ansätze 24 Stunden unter mehrfachem Schütteln an der Luft stehengelassen.

Methodik.

1/5 der in 24 Stunden sezernierten Harnmenge wird bei essigsaurer Reaktion im Vakuum bei 50—60° auf ungefähr 100 ccm eingedampft und dann bei der gleichen Reaktion mit einem geringen Überschuß 20%iger Bleiacetatlösung gefällt. Aus dem Filtrat wird durch Zusatz von 5—10%igem Ammoniak bei p_H 8 die wirksame Substanz als Bleiverbindung gefällt. Der abzentrifugierte Niederschlag wird durch Verreiben mit 5%iger Schwefelsäure bis zu kongosaurer Reaktion zersetzt. Die nach erneutem Zentrifugieren überstehende, Pb-freie klare Lösung wird unter Zusatz von

[12] SHAW, F. H.: Biochem. J. (Brit.) **32**, 19 (1938).

0,25 ccm konz. H_2SO_4 auf je 10 ccm 20 Min. lang im siedenden Wasserbad erhttzi. Nach dem Abkühlen wird mit 40%iger, dann mit 10%iger Natronlauge fast neutralisiert und die wirksame Substanz unter Zugabe von je 2 ccm Aluminiumhydroxydaufschwemmung* bei p_H 8 adsorbiert, anschließend durch zweimalige Behandlung des durch Zentrifugieren erhaltenen Adsorbats mit je 3 ccm 3%iger NaH_2PO_4-Lösung eluiert. *6 ccm Eluat* entsprechen dann $^1/_5$ *der Tagesmenge* Harn. Die kurz vor dem biologischen Versuch mit einigen Tropfen Natronlauge neutralisierten Eluate werden am Katzenblutdruck, am isolierten Darm usw. ausgewertet.

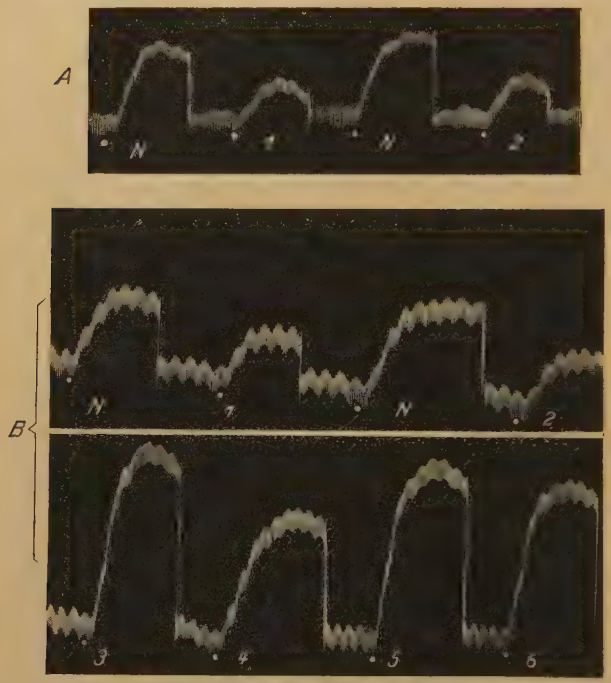


Abb. 3. Urosympathingehalt des Harns bei verschiedenen Hypertonieformen. Blutdruckversuche an der Katze.

A 1 ccm Harneluat i.v. *N* nierengesund, kreislaufnormal. *1, 2* akute Nephritiden. *B* 1,5 ccm Harneluat i.v. *N* nierengesund, blutdrucknormal. *1, 2* akute Nephritiden: H. R. ♂, Albumen ++, RR 180/125. K. Sch. ♀, Albumen Spur, RR 200/115. *3, 5* chronische Nephritiden: Rest-N 80—85 mg-%, Xanthoproteinreaktion +++, RR 200/110, 185/100. *4* Nephrosklerose, E. K. ♀, 50 J. RR 250/125. *6* essentielle Hypertonie H. P. ♂, 45 J., RR 220/120.

In der voraufgegangenen Arbeit[13] haben wir Beweise dafür erbracht, daß das sympathicomimetische vasopressorische Prinzip des Harns nicht nur aus Oxytyramin besteht. Es stellt wahrscheinlich ein Gemisch von *Oxytyramin, Arterenol* und *Adrenalin* dar und wurde von uns unter dem Gesichtspunkt, daß Arterenol und Adrenalin wahrscheinlich dem CANNONschen[14] Sympathin E bzw. I entsprechen und Oxytyramin als direkte Muttersubstanz der beiden Sympathine anzusehen ist, „*Urosympathin*" genannt. Nach Arbeitsleistung und bei manchen Fällen essentieller Hypertonie war der Gehalt des Harns an Urosympathin erhöht.

---

* 25 g Alaun — $KAl(SO_4)_2$ — werden in 200 ccm heißem Wasser gelöst und nach dem Abkühlen mit 20 ccm 25%iger NaOH gefällt. Der Niederschlag wird abgenutscht, auf der Nutsche mehrfach mit Aqua dest. gewaschen und in 100 ccm Aqua dest. suspendiert.

[13] HOLTZ, P., K. CREDNER u. G. KRONEBERG: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 228 (1947). — [14] CANNON, W. B. u. A. ROSENBLÜTH: Amer. J. Physiol. **104**, 557 (1933).

Die an mehr als 20 Patienten mit akuter Nephritis und Hochdruck sowie an 40 Gesunden durchgeführten Vergleichsversuche hatten das Ergebnis, daß der Harn der Nierenkranken ausnahmslos weniger Harnsympathin enthält als normaler Harn (Abb. 3). Auswertungen gegen Oxytyramin ergaben, daß die pressorische Wirksamkeit der 24-Stunden-Menge bei *Blutdrucknormalen* mit 2—3 mg Oxytyramin äquivalent ist, bei *essentieller Hypertonie* Werte bis zu 8 mg erreichen kann und bei *nephritischem Hochdruck* nur 1—1,5 mg Oxytyramin entspricht. Besondere Erwähnung verdient, daß die Retention des blutdrucksteigernden Stoffes durch die erkrankte Niere auch bei *normalen Rest-N-Werten* des Blutes beobachtet wird, also nicht mit der Retention anderer stickstoffhaltiger, harnpflichtiger Stoffwechselprodukte vergesellschaftet zu sein braucht. Eine Erklärung für diese „spezifische" Ausscheidungsinsuffizienz der Niere kann vielleicht darin erblickt werden, daß die blutdruckwirksamen Polyphenolverbindungen im Gegensatz zu anderen *direkt harnfähigen* N-haltigen Substanzen erst durch *Paarung* harnfähig gemacht werden müssen. Die Retention wäre dann dementsprechend nicht in einer Beeinträchtigung der exkretorischen Funktion der Niere *an sich* begründet, sondern in einer isolierten Störung des fermentativen Paarungsmechanismus im ischämischen Nierengewebe. Ein Analogon hierzu könnte in der unter Umständen ebenfalls schon bei fast normalen Rest-N-Werten durch den positiven Ausfall der Xanthoproteinreaktion sich bemerkbar machenden Retention bestimmter aus dem Darm zur Resorption gelangter, stickstoffhaltiger Fäulnisbasen erblickt werden, worauf besonders Becher[15] hingewiesen hat.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stehen in einem gewissen Gegensatz zu den Angaben von Bohn und Hahn [16], die pressorische Wirksamkeit des Harns sei gerade bei *renalem* Hochdruck *größer* als bei *normalem* Blutdruck oder auch bei *essentieller* Hypertonie. In vorangehenden Arbeiten [21, 13] haben wir darauf hingewiesen, daß das von uns nachgewiesene sympathicomimetische, blutdrucksteigernde Prinzip des Harns — „Urosympathin" — zum größten Teil in *gebundener*, *unwirksamer Form* vorliegt und deshalb nicht erfaßt wird, wenn die Aufarbeitung nicht mit einer Säurehydrolyse verbunden ist. Die beiden Autoren benutzten, ohne vorher zu hydrolysieren, eine unspezifische Methode zur Isolierung der wirksamen Substanz: Adsorption an Tierkohle und Extraktion mit Alkohol oder Aceton. Ihre Ergebnisse wurden unter Anwendung der gleichen unspezifischen Methode weder bei einer Nachprüfung durch Coester [17], noch in einer späteren Arbeit französischer Forscher [18] bestätigt. Diese kommen vielmehr in Übereinstimmung mit unseren Befunden zu dem Ergebnis, daß die blutdrucksteigernde Wirkung des Harns bei nephritischem Hochdruck gegenüber der Norm vermindert ist. Die einzige — schon weit zurückliegende — Arbeit, in der vielleicht ein dem Urosympathin ähnlicher Stoff isoliert wurde, scheint die von Bain [19] zu sein. Bei der von Bain angewandten Aufarbeitungsmethode — Ausschüttelung des Harns mit Amylalkohol bei alkalischer Reaktion — hätte das Urosympathin unserer Versuche, wenigstens soweit es in *freier* Form vorliegt, unter Umständen erfaßt werden müssen.

[15] Becher, E.: Erg. Med. **18**, H. 1 (1933). — [16] Bohn, H. u. F. Hahn: Z. klin. Med. **123**, 558 (1933). — [17] Coester, C.: Z. klin. Med. **128**, 656, 665 (1935). — [18] Riser u. Barbier: Presse méd. **1939**, 649. — Riser u. Dardenne: Presse méd. **1943**, 2. — [19] Bain, W.: Quart. J. exper. Physiol. 8, 229 (1915). — Lancet **1910**, 1190.

Bei anderer Gelegenheit [20] haben wir schon betont, daß die *Methode*, mit der BAIN in Unkenntnis der chemischen Eigenschaften des zu isolierenden Stoffes arbeitete, allerdings geradezu als mörderisch für Urosympathin bezeichnet werden muß, da die Urosympathinkomponenten durch mehrfaches Ausschütteln der stark alkalischen Lösungen schnell zerstört werden. Es ist deshalb verständlich, wenn BAIN zu der Annahme kommt, die im Amylalkohol lösliche pressorische Substanz trete nur sporadisch auf und sei kein regelmäßiger Harnbestandteil. Immerhin findet sich in seiner Veröffentlichung die Anmerkung, daß die Pressorsubstanz des Harns in mehreren von ihm untersuchten, allerdings nicht näher gekennzeichneten Fällen von „hohem Blutdruck" stark vermindert bzw. überhaupt nicht nachweisbar war.

Wie bei der *essentiellen* Hypertonie die *Überproduktion*, so würde bei der *renalen* Hypertonie die *Retention* von Urosympathin für die Erhöhung des Blutdrucks Bedeutung gewinnen können. Es ist aber unwahrscheinlich, daß die Retention intermediär gebildeter stickstoffhaltiger pressorischer Substanzen, selbst wenn man eine durch verminderte oxydative Zerstörung bedingte relative Vermehrung solcher Stoffe mit in Rechnung setzt, die pathologische Blutdrucksteigerung bei renaler Hypertonie befriedigend zu erklären vermöchte. Denn die Klinik kennt Fälle stärkster Retention stickstoffhaltiger Stoffwechselschlacken ohne Blutdrucksteigerung, und andererseits führt im Tierexperiment die vollständige Extirpation beider Nieren während der allerdings nur kurzen Überlebenszeit trotz hoher Rest-N-Werte nicht zu einer Erhöhung des Blutdrucks. Ähnlich wie bei der *essentiellen Hypertonie* eine tatsächliche und absolute *Mehrproduktion* an „Urosympathin", hier vor allem wohl an Arterenol- und Adrenalinkomponente, vielleicht ein wesentlicher pathogenetischer Faktor ist, indem vermutlich infolge einer gesteigerten Erregbarkeit vasomotorischer Zentren oder eines generell erhöhten Tonus des sympathischen Nervensystems größere Mengen Sympathin E und I an den Nervenendigungen zur Ausschüttung kommen[13], so müßte auch bei der *renalen Hypertonie* eine tatsächlich und absolut *erhöhte Bildung* pressorischer Stoffe, in diesem Falle vielleicht insbesondere von Oxytyramin, der an sich schon wirksamen Muttersubstanz der Sympathine, von Bedeutung sein. Darauf weisen Versuche hin, in denen die Harne von Patienten mit *chronischer Nephritis* und *Nephrosklerose* untersucht wurden. Obwohl hier die Rest-N-Werte des Blutes oft deutlich erhöht waren und die Xanthoproteinreaktion positiv ausfiel, lag der Urosympathingehalt des Harns nie wie bei akuter Nephritis unter der Norm, sondern war im Gegenteil — zwar nicht regelmäßig, aber doch in vielen Fällen — stark vermehrt und konnte dann Werte erreichen, wie wir sie in der voranstehenden Arbeit häufig bei essentieller Hypertonie fanden. Auch hierfür gibt die Abb. 3 Beispiele. Hierbei fiel auf, daß die freien, nicht gepaarten Anteile des vermehrt ausgeschiedenen Urosympathins im Gegensatz zur Norm häufig größer waren als der gebundene, erst nach der Hydrolyse nachweisbare Anteil. In diesen Fällen, in denen ganz sicher eine Ausscheidungsinsuffizienz der Niere vorliegt, kann die außerhalb jeder Fehlergrenze

[20] HOLTZ, P. u. K. CREDNER: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **200**, 356 (1942).

liegende Erhöhung der Ausscheidung blutdrucksteigernder Substanzen wohl nur durch eine Überproduktion der pressorischen Stoffe erklärt werden.

*Überproduktion von Oxytyramin**. Die Dopadecarboxylase übt, wie schon erwähnt, auch unter physiologischen Verhältnissen, am normalen Tier mit gesunden Nieren ihre Wirkung aus; denn nach Verabfolgung von Dopa enthält der Harn Oxytyramin[11]. Das geht auch aus anderen Versuchen[21] hervor, in denen die *hyperglykämische* Wirkung parenteral injizierten Dopas auf die intermediäre Bildung von Oxytyramin zurückgeführt werden konnte. Versuche an Katzen zeigten schließlich, daß die intravenöse Injektion größerer Dopamengen infolge der enzymatischen Decarboxylierung der unwirksamen Aminosäure zu blutdruckwirksamem Oxytyramin blutdrucksteigernd wirkt[11]. Das Ferment entfaltet also auch unter physiologischen Bedingungen, d. h. in der intakten und normal durchbluteten Niere seine Wirkung. Die Versuchsbedingungen waren jedoch insofern unphysiologisch, als das Manifestwerden der beobachteten Wirkungen die Applikation *hoher* Dopamengen, wie sie unter physiologischen Verhältnissen im Blut sicher nicht zur Verfügung stehen, erforderte. In weiteren Versuchen zeigte sich nun, daß auch *kleine* Mengen Dopa — 1—2 mg — starke und langdauernde Blutdrucksteigerungen verursachen, wenn die Dopadecarboxylase nicht nur wie normal als „Desmoenzym" fest verankert in den Nierenzellen sitzt, sondern als „Lyoenzym" im Blute kreist. Wir erreichten das dadurch, daß wir vor der Injektion von Dopa fermenthaltige Extrakte in die Blutbahn brachten.

Methodik. Darstellung von Dopadecarboxylase aus Schweineniere.

1. *Fällung frischer Extrakte bei* p_H *5,2.* 50 g Nierenrinde werden mit Quarzsand zu Brei verrieben und mit 250 ccm 0,9%iger NaCl-Lösung extrahiert. Der durch Zentrifugieren gewonnene Extrakt wird unter Eiskühlung und Umrühren mit 25 ccm m/1 Natriumacetatpuffer von p_H 5,2 versetzt, das nach einigen Minuten ausgefallene Ballasteiweiß in der Zentrifuge abgetrennt und die überstehende Lösung mit der gleichen Menge gesättigter $(NH_4)_2 \cdot SO_4$-Lösung gefällt. Nach $^1/_2$stündigem Stehen in der Kälte wird der entstandene Niederschlag abzentrifugiert, in 25 ccm Aqua dest. gelöst und in Cellophanschläuchen zur Entfernung des Ammonsulfats 24 Stunden lang gegen fließendes Wasser dialysiert. Durch Zusatz von 20%iger NaCl-Lösung wird der Inhalt des Dialysierschlauches auf eine NaCl-Konzentration von 0,9% gebracht und vom Ungelösten abzentrifugiert. Die überstehende Lösung, deren Volumen während der Dialyse durch Hineindiffundieren von Wasser mitunter um ungefähr 25% angestiegen ist, wird zum Versuch benutzt.

2. *Acetontrockenpulver.* 50 g Nierenbrei werden mit 150 ccm Aceton verrieben. Der durch Abnutschen erhaltene Rückstand wird nochmals mit 75 ccm Aceton digeriert, der abgenutschte Rückstand lufttrocken im Vakuumexsikkator über Blaugel aufbewahrt. Zum Versuch dienen NaCl-Extrakte des Trockenpulvers: 5 g Acetonpulver werden mit 25 ccm, der Rückstand noch einmal mit 12,5 ccm 0,9%iger NaCl-Lösung extrahiert.

* Experimentell mitbearbeitet von F. Drenkhahn.

[21] Holtz, P. u. K. Credner: Hoppe-Seylers Z. 280, 9 (1943).

Kochsalzextrakte aus Acetonpulver (Abb. 4*A*) wie Frischextrakte die bei p_H 5,2 gefällt wurden, verursachen bei intravenöser Injektion, an der Katze eine langsam einsetzende und dann langdauernde Blutdrucksteigerung. Injiziert man auf der Höhe der Blutdruckkurve 1—2 mg Dopa, die sonst erfahrungsgemäß ohne jede Wirkung sind, so erhebt sich die Kurve zu einem erneuten protrahiert verlaufenden Anstieg. Die im Blut des Versuchstieres kreisende Dopadecarboxylase wandelt die injizierte unwirksame

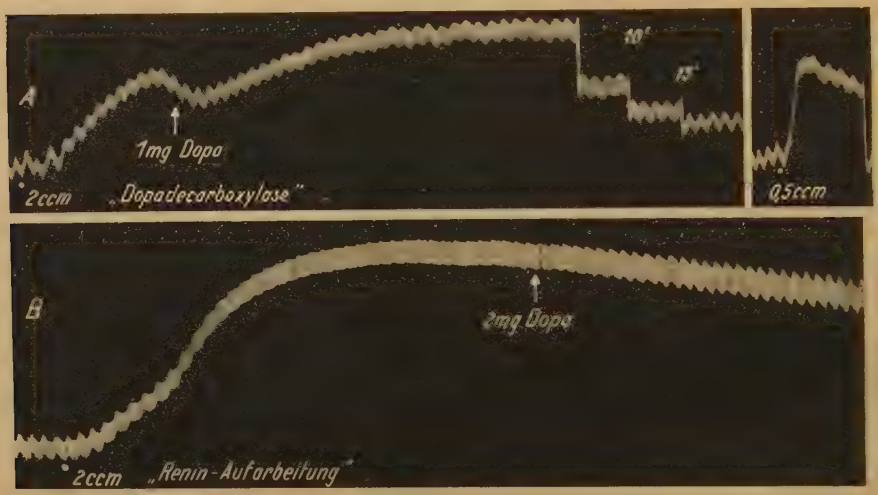


Abb. 4. Dopadecarboxylase. — Renin.
Katzenblutdruck, Pernoctonnarkose. *A* 2 ccm: intravenöse Injektion eines „Dopadecarboxylase"-Präparates aus Acetonpulver (Schweineniere) (s. S. 253 Methodik 2). 0,5 ccm eines Gemisches von 3 ccm „Dopadecarboxylase" + 2 mg l-Dopa in 0,5 ccm Aqua dest. 20 Min. bei 37 °. *B* 2 ccm intravenöse Injektion eines „Renin"Präparates (s. S. 249 Methodik).

Aminosäure allmählich in das blutdrucksteigernde Amin — Oxytyramin — um. Das bestätigen Versuche, in denen man diese Umwandlung nicht in vivo, sondern in vitro sich vollziehen läßt. Wirkt derselbe Extrakt, der soeben *innerhalb des Gefäßsystems* der Katze Dopa allmählich decarboxylierte, 20 Min. lang *im Reagenzglas* bei 37° auf Dopa ein, so führt die Injektion der jetzt oxytyraminhaltigen Lösung zu einem akuten, steilen Blutdruckanstieg durch das direkt wirksame Amin. Das im Blute der Versuchskatze kreisende Ferment bleibt lange wirksam. 30 und selbst 45 Min. nach der Injektion verursacht Dopa immer noch deutliche, mit jeder Injektion schwächer werdende Blutdruckwirkungen. Für weitergehende Reinigungsversuche ist die bei einer Aminosäuredecarboxylase wohl erstmalig gemachte Beobachtung von Bedeutung, daß die Dopadecarboxylase in Form von Acetontrockenpulver als *Dauerpräparat* gewonnen werden kann, dessen Wirksamkeit bei kühler Aufbewahrung im Exsikkator wochenlang erhalten bleibt.

Die von den fermenthaltigen Extrakten *selbst* — ohne nachträgliche Injektion von Dopa — hervorgerufenen Blutdrucksteigerungen (s. Abb. 4A) beruhen nun aber, wie die folgenden Versuche zeigen, nicht auf ihrem Gehalt an Dopadecarboxylase. Das *direkt* wirksame pressorische Prinzip dieser Extrakte ist nicht Dopadecarboxylase, sondern „*Renin*".

Renin*.

Vor fast 50 Jahren berichteten Tigerstedt und Bergmann [22] über ein blutdrucksteigerndes Prinzip, das sie aus frischer Kaninchenniere durch Extraktion mit physiologischer Kochsalzlösung erhielten und, da sich aus keinem anderen Organ eine Substanz gleicher Wirkungsart gewinnen ließ, *Renin* nannten. Die intravenöse Injektion einiger ccm Reninlösung führte zu einem langsamen, aber langdauernden Blutdruckanstieg. Schon den Entdeckern fiel auf, daß kurz aufeinanderfolgende Injektionen der gleichen Dosis bald an Wirksamkeit verloren und schließlich unwirksam blieben. Über die schon von Bingel und Strauss [23] durch Ammonsulfatfällung erreichte Anreicherung des wirksamen Prinzips hinaus gelangte man in der Folgezeit unter Anwendung moderner Fermentmethoden zu weitgehend von Ballasteiweiß befreiten hochwirksamen Präparaten [24].

Prinzipiell neue Gesichtspunkte ergaben die Arbeiten von Houssay [25] und von Page [26], indem sie zu der Erkenntnis führten, daß *Renin selbst* wahrscheinlich gar nicht die pharmakologisch wirksame, blutdrucksteigernde Substanz („Hypertensin") ist, sondern diese aus einer der Globulinfraktion der Blutplasmaeiweißkörper angehörenden unwirksamen Vorstufe („Hypertensinogen") entstehen läßt. Dem Renin wird *Fermentnatur* zugesprochen: es ist thermolabil, hochmolekular und deshalb nicht dialysierbar, seine Wirkung entwickelt sich, wenn man es *in vitro* mit Blutglobulinen bei 37° zusammenbringt, langsam und dem entspricht der protrahierte Wirkungsablauf *in vivo*. „*Hypertensin*", angeblich ein kleinmolekulares Peptid, hitzestabil und dialysierbar, charakterisiert durch eine prompte, nur kurzdauernde adrenalinähnliche Blutdruckwirkung, soll von Renin wie von einem protoelytischen Ferment aus Globulinen bzw. ihnen anhaftender, jedenfalls unwirksamer Vorstufe oder Muttersubstanz („Hypertensinogen") abgespalten werden. Im Blut, vor allem aber in der gesunden, normal durchbluteten Niere ist anscheinend ein anderer Faktor von Fermentnatur

* Experimentell mitbearbeitet von E. Künzelmann u. F. Drenkhahn.

[22] Tigerstedt, R. u. P. G. Bergmann: Skand. Arch. Physiol. (D.) 8, 223 (1898). — [23] Bingel, A. u. E. Strauss: Arch. klin. Med. **96**, 476 (1909). — [24] Hessel, G.: Klin. Wschr. **1938 I**, 843. — Pickering, G. W. u. M. Prinzmetal: Clin. Sci. **3**, 211 (1938). — Braun-Menendez, E., J. C. Fasciolo, L. F. Leloir u. J. M. Munoz: J. Physiol. (Brit.) **98**, 283 (1940). — Euler, U. S. v.: Acta Soc. physiol. Scand. (D.) **2**, 274 (1941); **5**, 183 (1943). — [25] Houssay, B. A. u. Mitarb.: J. Physiol. (Brit.) **94**, 281 (1938). — [26] Page, I. H. u. Mitarb.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **39**, 214 (1938); **44**, 360 (1940). — J. exper. Med. (Am.) **73**, 7 (1941).

vorhanden („Hypertensinase"), der das entstandene Hypertensin vermutlich durch Abbau zu unwirksamen Produkten inaktiviert. Denn bei der Einwirkung von Renin auf Blut *in vitro* durchläuft, der Hypertensinbildung entsprechend, die Wirkungskurve ein Maximum, das nach ungefähr 15—30 Min. erreicht wird, um dann im Verlauf der folgenden 30—45 Min. wieder auf Null abzusinken, und *in vivo* — bei intravenöser Injektion im Blutdruckversuch sind Renin und Hypertensin nach Nephrektomie stärker wirksam. Den angenommenen Beziehungen entspricht das Reaktionsschema:

$$\text{Hypertensinogen} \xrightarrow{\text{Renin}} \textit{Hypertensin} \xrightarrow{\text{Hypertensinase}} \text{unwirksame Produkte.}$$

Eine nochmalige Aufzeichnung des für die *Dopadecarboxylase* geltenden Reaktionsablaufs macht die sich aufdrängenden Parallelen zwischen Renin und Dopadecarboxylase deutlich:

$$\text{Dopa} \xrightarrow{\text{Dopadecarboxylase}} \textit{Oxytyramin} \xrightarrow{\text{Aminoxydase}} \text{pressorisch unwirksame Produkte}$$

Nimmt man in Nierenextrakten die Ausfällung von Ballasteiweiß nicht wie in den Versuchen zur Darstellung der Dopadecarboxylase mit Natriumacetatpuffer bei p_H 5,2, sondern durch Zusatz von Eisessig bei p_H 2,5—3,0 vor, so erhält man Präparate, die stärker blutdruckwirksam sind als die bei weniger saurer Reaktion gefällten Lösungen.

Als beste Methode erwies sich uns die folgende:

Methodik der Renindarstellung. Ausgangsmaterial: Acetontrockenpulver aus Schweineniere. 10 g Acetonpulver werden mit 50 ccm, der Rückstand nochmals mit 25 ccm 1—2%iger NaCl-Lösung extrahiert. Fällung der vereinigten Extrakte mit 1,0—1,5 ccm Eisessig in der Kälte, nach 5 Min. Abzentrifugieren von ausgefallenem Ballasteiweiß. Fällung der klaren überstehenden Lösung mit der gleichen Menge gesättigter $(NH_4)_2 \cdot SO_4$-Lösung. Nach $^1/_2$stündigem Stehen wird der durch Zentrifugieren erhaltene Niederschlag („Renin") in 10—15 ccm Aqua dest. verrieben und durch Cellophan 24 Stunden lang gegen fließendes Wasser dialysiert. Der Inhalt des Dialysierschlauches wird durch Zusatz 20%iger Kochsalzlösung auf einen NaCl-Gehalt von 0,9% gebracht. Die nach dem Abzentrifugieren vom Ungelösten bleibende Lösung dient als Reninpräparat: „Reninaufarbeitung" der Abb. 4B.

Die mit dieser Methode gewonnenen Reninpräparate sind zwar pressorisch sehr wirksam, jedoch ohne jede Wirkung auf Dopa: sie vermögen die Aminosäure weder in vivo noch in vitro zu decarboxylieren (Abb. 4 *B*). Im Gegensatz zu Renin wird Dopadecarboxylase durch Essigsäure bei p_H 2,5 gefällt oder zerstört. „*Renin*" und *Dopadecarboxylase* sind also nicht miteinander identisch, sie sind zwei präparativ voneinander trennbare, in der Nierenrinde vorkommende Faktoren. Ihre Substrate sind dementsprechend auch voneinander verschieden.

Nach den erwähnten Befunden der amerikanischen Autoren sind die *Blutglobuline* das Substrat für die Fermentwirkung des Renins. Wir haben diese Befunde bestätigen können und versucht, weiteren Aufschluß über die Natur der unter der Einwirkung von Renin aus den Bluteiweißkörpern

entstehenden direkt blutdrucksteigernden Substanz — des sog. „Hypertensins" — zu erhalten.

Methodik der Hypertensindarstellung. 50 ccm auf 37° vorgewärmtes Rinderserum werden mit 2,5—5,0 ccm einer Reninlösung versetzt und 25 Min. lang bei 37° gehalten. Durch Zusatz von 150 ccm Alkohol wird enteiweißt, und das Filtrat im Vakuum bei 40—50° zur Trockene eingedampft. Es hinterbleibt ein stark gelb gefärbter Rückstand,

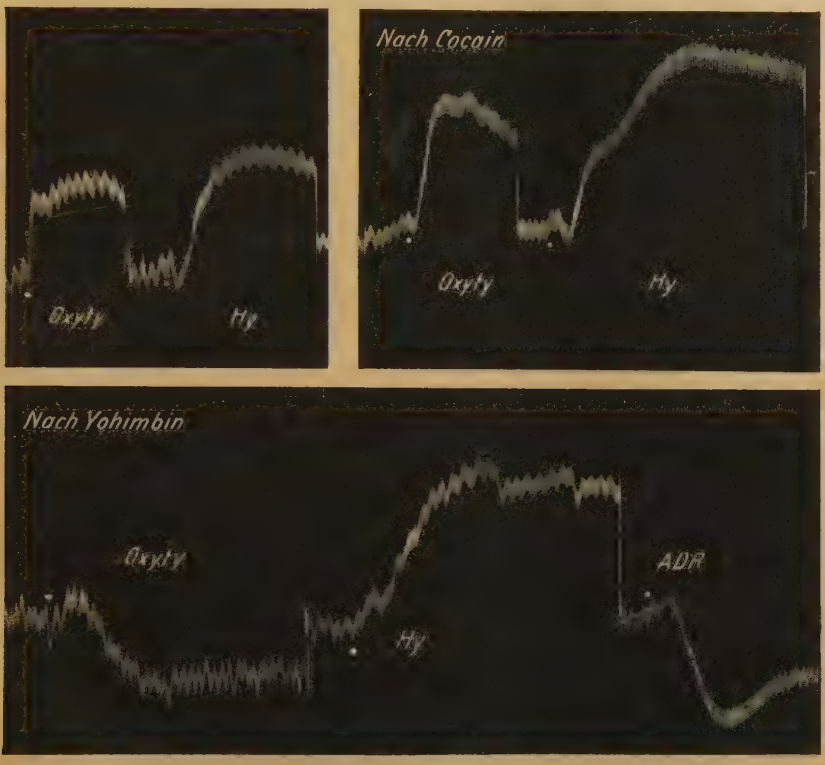


Abb. 5. Hypertensin.
Katze, 2,8 kg. Pernoctonnarkose. Cocain 10 mg/kg i.m. — Yohimbin 7 mg/kg i.m. *Oxyty* 100 γ Oxytyramin; *Hy* 0,5 ccm „Hypertensin" (s. oben Methodik); *ADR* 5 γ Adrenalin.

der in 5 ccm Aqua dest. aufgenommen wird. Die gelbe trübe Lösung wird nach Ansäuern mit einigen Tropfen 10%iger Salzsäure 2mal mit der 6fachen Menge Äther ausgeschüttelt. Unter diesen Bedingungen — nicht bei neutraler Reaktion — geht der gelbe Farbstoff in den Äther; es bleibt eine farblose, klare wäßrige Lösung, die nach der Neutralisation mit Natronlauge injiziert werden kann („Hypertensin"). Als Kontrolle dient ein gleichartiger Versuchsansatz, der aber *sofort* aufgearbeitet wird, ohne daß es zu einer längeren Einwirkung von Renin kommt.

Wie schon von den amerikanischen Forschern beschrieben, wirkt Hypertensin als direkt wirksame Substanz im Gegensatz zu Renin prompt und ohne Latenz blutdrucksteigernd und zeigt keine Tachyphylaxie. Die Blutdruckerhöhungen sind von kürzerer Dauer als nach Renin. In weiteren

Versuchen fanden wir, daß die pressorische Hypertensinwirkung ähnlich wie diejenige des Adrenalins und Oxytyramins durch *Cocain* verstärkt wird, im Gegensatz aber zum pressorischen Effekt der beiden Amine durch

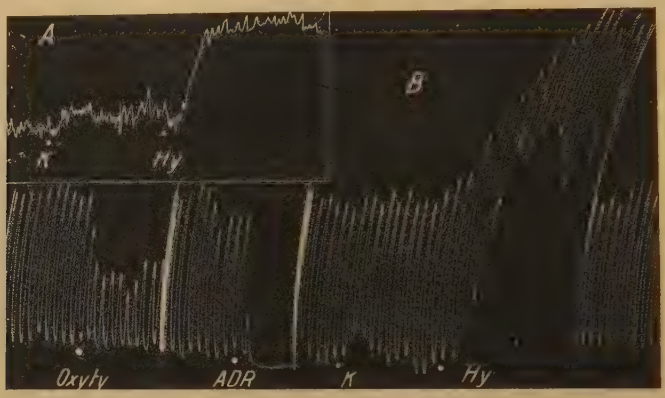


Abb. 6. Hypertensin.
Isolierter Darm in 20 ccm Tyrodelösung. *A* Meerschweinchenrektum; *B* Kaninchendünndarm: *Hy* 0,25 ccm „Hypertensin", 10fach mit Aqua dest. verdünnt (s. S. 257, Methodik); *K* 0,25 ccm „Hypertensin" — Kontrolle (s. Methodik auf S. 257); *Oxyty* 40 γ Oxytyramin; *ADR* 1 γ Adrenalin.

Ergotoxin oder *Yohimbin* keine Umkehr in eine depressorische Wirkung erfährt, ja nicht einmal abgeschwächt wird (Abb. 5). Ein ähnliches Verhalten beobachtet man in Versuchen mit der vasopressorischen Fraktion

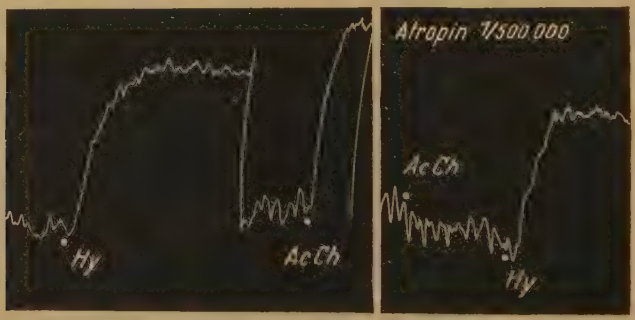


Abb. 7. Hypertensin/Atropin.
Meerschweinchenrektum. 20 ccm Tyrodebad 37°. *Hy* 0,2 ccm Hypertensin; *AcCh* 0,5 γ Acetylcholin.

von Hypophysenhinterlappenextrakten (Vasopressin, Pitressin, Tonephin). In Untersuchungen am isolierten Kaninchen- und Meerschweinchendarm ergeben sich weitere Anhaltspunkte für die gleichartige Wirkung von „*Hypertensin*" und *Hypophysenhormon*: beide wirken im Gegensatz zu Adrenalin, Oxytyramin und Arterenol erregend (Abb. 6 und 7). *Tyramin* würde den Darm der beiden untersuchten Tierarten ebenfalls zur Kontraktion bringen. Der sensibilisierende Einfluß von Cocain auf die

Blutdruckwirkung des Hypertensins erlaubt jedoch eine sichere Abgrenzung, da die pressorische Tyraminwirkung durch *Cocain* aufgehoben wird.

Die bisherigen Versuchsergebnisse weisen somit auf die Möglichkeit einer Identität von „*Hypertensin*" mit dem „*Vasopressin*" des Hypophysenhinterlappens hin. Würde diese sich als tatsächlich bestehend erweisen lassen, — was in endgültig überzeugender Form wohl nur am hypophysektomierten Tier geschehen könnte; hier müßte Renin bei intravenöser Injektion unwirksam sein und dürfte in vitro bei der Einwirkung auf das Blut dieser Tiere kein „Hypertensin" entstehen lassen —, so ergäben sich neuartige und bisher ungeahnte Beziehungen zwischen Niere und Hypophyse, wie andererseits unsere Kenntnisse von der *physiologischen* Funktion der vasopressorischen Hinterlappenfraktion eine Bereicherung erführen. In *Diureseversuchen* an Ratten mit Hypertensin und blutdruckäquivalenten Mengen des Handelspräparates Tonephin, das beide Wirkungskomponenten des Hypophysenhinterlappens, die vasopressorische und die antidiuretische, nicht voneinander trennbar enthält, erwies Hypertensin sich als unwirksam (Tabelle 1). Das brauchte aber vielleicht nicht unbedingt gegen eine Identität, sondern könnte zugunsten der dualistischen Annahme zweier voneinander verschiedener Wirkstoffindividuen in der Drüse sprechen.

Tabelle 1. *Beeinflussung der Diurese durch Hypertensin und Vasopressin.*

Je 2 Ratten (180—200 g) in Diuresekäfigen. 5 ccm/100 g Wasser peroral. Hypertensin bzw. Pituglandol intramuskulär *.

Diurese in Prozent der verabfolgten Wassermenge.

Zeit	60 Min.	120 Min.	180 Min.	240 Min.
Kontrollen	26%	60%	81%	85%
Pituglandol ** 0,002 VE	—	—	35%	88%
Hypertensin ** 0,5 ccm 1:1000	24%	51%	65%	87%
Hypertensin *** 0,5 ccm unverdünnt	20%	54%	72%	78%

Man müßte sich vorstellen, daß das vom Hypophysenhinterlappen sezernierte und wenigstens zum Teil über den Liquor ins Blut gelangende Vasopressin hier von den Blutglobulinen gebunden würde, um dann in der Niere mit Hilfe eines in der Rinde lokalisierten Mechanismus, des hier in den Zellen verankerten Renins, unter *physiologischen* Verhältnissen „dem Bedarf entsprechend" —, d. h. gemäß seiner Aufgabe, sich an der physiologischen Regulation des Blutdrucks zu beteiligen — entbunden und damit frei und wirksam zu werden; unter *pathologischen* Verhältnissen, bei mangelhafter Blut- und Sauerstoffversorgung, bei einer Ischämie des Nierengewebes müßte es in erhöhtem Maße zum Freiwerden des eiweißgebundenen Hormons kommen und damit zu einer pathologischen Erhöhung des Blutdrucks. Dabei würde die starke kapillarverengernde Wirkung des Vasopressins, seine bei intravenöser Injektion am Menschen „*Leichenblässe*" erzeugende Wirkung es besonders geeignet erscheinen lassen als die pressorische Substanz des „blassen *Hochdrucks*".

Es entsteht die Frage, in welcher Weise die Ischämie der Niere in diesem Zusammenhang zum ursächlichen Faktor der Blutdrucksteigerung wird.

* Einzelheiten der Methodik s. Holtz, Credner, u. Heepe: Arch. exper. Path. (im Druck). — ** Am Katzenblutdruck miteinander äquivalente Mengen. *** 1000mal *mehr* als blutdruckäquivalent mit 0,002 VE Pituglandol.

Ischämie der Niere und „vasopressorische Sekretion".

Für das Auftreten pharmakologischer Wirkungen ist Voraussetzung, daß die *Konzentration* des Pharmakons den Schwellenwert der Wirkung überschreitet. Wenn das Pharmakon wie im Falle des Oxytyramins oder Hypertensins durch die Wirkung eines Fermentes entsteht, wird die zustande kommende Konzentration von der Geschwindigkeit und Intensität der fermentativen Reaktion maßgeblich abhängen. Diese is aber sicher größer, wenn Ferment und Substrat — *Dopadecarboxylase* und *Dopa*, *Renin* und das an Bluteiweiß gebundene „*Hypertensinogen*" — sozusagen in freier Blutbahn aufeinandertreffen (vgl. Abb. 4 *A*), als wenn das Substrat

Abb. 8. Nierenperfusate. — Dopadecarboxylase- und Reninwirkung. Schweineniere, 48 Stunden im Eisschrank aufbewahrt, mit NaCl-Lösung durchströmt (s. Methodik unten).

erst durch die Wandungen der Nierenzellen hindurch den Weg zu dem hier verankerten Ferment gehen muß. Das Zirkulieren des Fermentes im strömenden Blut — *experimentell* durch Injektion fermenthaltiger Extrakte in die V. jugularis leicht herbeizuführen — müßte beim Drosselungshochdruck des Hundes und bei der renalen Hypertonie des Menschen durch eine Dauerinfusion von Ferment aus der ischämischen Niere in die V. renalis bewerkstelligt werden.

Wir haben die für die ischämische Niere angenommenen Verhältnisse in allerdings etwas krasser Form nachzuahmen versucht, indem wir Schweinenieren nach 12-, 24- und 48stündiger Aufbewahrung mit physiologischer Kochsalzlösung durchströmten und die Perfusate auf Renin- und Dopadecarboxylasewirkung untersuchten.

Methodik. Frische Schweinenieren werden durch eine in die Art. renalis eingebundene Glaskanüle mit 0,9%iger NaCl-Lösung blutfrei gewaschen. Anschließend bzw. nach 12-, 24- oder 48stündiger *Aufbewahrung im Eisschrank* wird die Durchspülung mit Hilfe einer 50-ccm-Pravazspritze wiederholt und das aus der V. renalis austretende Perfusat 5—6mal rückinjiziert. — Zur Untersuchung auf *Dopadecarboxylase* wird das unveränderte Perfusat benutzt: 5 ccm Perfusat + 2 mg Dopa in 0,5 ccm Aqua dest. 20—30 Min. bei 37°. Zur Darstellung von *Renin* werden 20 ccm Perfusat bei essigsaurer Reaktion (ungefähr p_H 2,5) mit der gleichen Menge gesättigter $(NH_4)_2 \cdot SO_4$-Lösung gefällt und nach einigem Stehen zentrifugiert. Die in 5 ccm Aqua dest. aufgenommene Fällung wird 24 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert.

Das *Perfusat* der frisch und nach 12 Stunden durchströmten Niere ist wirkungslos oder zeigt im letzteren Falle nur geringfügige Dopadecarboxylasewirkung. Die nach 24 und besser noch nach 48 Stunden erhaltenen Perfusate hingegen besitzen nach der Aufarbeitung ausgeprägte *Reninwirkung* und enthalten *Dopadecarboxylase* in hoher Konzentration (Abb. 8).

Aus diesen Versuchen an der nicht mehr durchbluteten und ernährten, im Eisschrank autolysierenden Niere lassen sich natürlich keine bindenden Rückschlüsse auf das Verhalten des im Körper verbliebenen, nur gedrosselten Organs ziehen. Immerhin könnten fließende Übergänge zwischen *„autolytischem Freiwerden in vitro"* und *„vasopressorischer Sekretion in vivo"* bestehen. Die Ischämie würde zu einem Freiwerden bisher an Zellbestandteilen verankerten Fermentes und zu dessen „Sekretion" durch die fermentdurchlässig gewordenen Zellwandungen führen.

Renin und Dopadecarboxylase.

Renin findet als Substrat seiner Wirkung das mit Plasmaeiweiß gekoppelte „Hypertensinogen" meistens in genügender Menge im Blute vor, so daß es, wenn das Ferment ins Blut gelangt, zur Bildung von „Hypertensin" und damit zur Blutdrucksteigerung kommt. Die *Aminosäuredecarboxylasen*, z. B. die Dopadecarboxylase finden ihre Substrate — die entsprechenden Aminosäuren — in der Blutbahn offenbar nicht in der Konzentration vor, die eine blutdrucksteigernde Aminbildung ermöglicht. Denn die intravenöse Injektion eines Dopadecarboxylasepräparates führt nur dann zu einer pressorischen Wirkung, wenn gleichzeitig oder anschließend Dioxyphenylalanin injiziert wird. Es muß gefragt werden, ob die Dopadecarboxylase an dem zu Blutdruckerhöhung führenden Mechanismus der renalen Hypertonie überhaupt beteiligt ist.

Die sog. *Tachyphylaxie* der Reninwirkung, d. h. die mit jeder Injektion schwächer werdende und schließlich ganz ausbleibende Blutdruckwirkung kann ihre Ursache nicht in einer Un- bzw. Unterempfindlichkeit der Erfolgsorgane, in diesem Falle also vor allem der Gefäßwandungen haben; denn das eigentlich blutdrucksteigernde Prinzip, das unter der Reninwirkung sich bildende Hypertensin, ist von gleichbleibender Wirksamkeit. Die bei der blutdrucksteigernden Wirkung des Hypophysenhormons, des pressorischen und antidiuretischen *Vasopressins*, so ausgeprägte echte Tachyphylaxie, die es notwendig macht, mit der zweiten Injektion eine Stunde oder noch länger zu warten, um den Effekt der ersten Injektion wieder zu erhalten, fehlt der Hypertensinwirkung vollkommen. Dadurch wird die mit Rücksicht auf das sonst in mancher Beziehung gleichartige pharmakologische Verhalten diskutierte Möglichkeit einer Identität von Hypertensin und Vasopressin unwahrscheinlich. Die „Tachyphylaxie" der Reninwirkung dürfte unter Berücksichtigung des Fermentcharakters des Renins ihre Erklärung in einer Erschöpfung der Substratvorräte, also der Hypertensinogenmengen des Blutes finden. Dem bei einer „vasopressorischen Sekretion" von Renin durch die ischämische Niere zu erwartenden erhöhten *Verbrauch* an Hypertensinogen muß eine gesteigerte *Regeneration* entsprechen, wenn die Entwicklung einer „Tachyphylaxie" infolge der Erschöpfung des Fermentsubstrats verhütet werden und der z. B. im Anschluß an eine experimentelle Drosselung der Nierendurchblutung auftretende, über Monate und Jahre dauernde Blutdruckanstieg zustande kommen soll.

In Übereinstimmung mit kürzlich von v. Euler[27] mitgeteilten Befunden haben auch wir wiederholt die Beobachtung gemacht, daß an sich wirksame Reninpräparate im Blutdruckversuch an der Katze schon bei der ersten Injektion wirkungslos waren.

[27] Euler, U. v.: Acta Soc. physiol. scand. (D.) 5, 183 (1943).

Eine nachträgliche Durchsicht unserer Versuchsprotokolle ergab, daß es sich bei diesen nur seltenen „Reninversagern" um schlecht ernährte Tiere handelte, die insbesondere, durch die Zeitverhältnisse bedingt, ungefähr eine Woche lang sehr *eiweißarm* ernährt worden waren.

Für die Frage nach der Natur etwa bestehender Beziehungen zwischen dem *Eiweißgehalt der Nahrung* und dem Gehalt des Blutes an Hypertensinogen ist vielleicht eine Beobachtung Cannons, auf die wir schon einmal in anderem Zusammenhang eingegangen sind[13], von Interesse. In seinen Untersuchungen zur humoralen Übertragung sympathischer Nervenerregungen fand Cannon[28] die im Anschluß an eine elektrische Reizung freiwerdenden *Sympathinmengen* bzw. die durch sie verursachten Wirkungen bei solchen Versuchstieren besonders groß, die vorher eiweißreich ernährt worden waren. Aromatische Eiweißbausteine, vor allem wohl *Tyrosin*, vielleicht auch *Dioxyphenylalanin*, werden es nach physiologisch-chemischen Erwägungen sein, die der Organismus als Muttersubstanz für die Sympathinbildung benutzt. Es bestehen nun, wie auch aus unseren Versuchen hervorgeht, wesentliche pharmakologische Unterschiede zwischen *Sympathin* und *Hypertensin*. Im Gegensatz zum darm*lähmenden* Sympathin wirkt Hypertensin ähnlich wie die O'Connorschen[29] „Constrictine" (oder die gefäßverengernden „Spätgifte[30]") des Blutes am Darm *erregend;* ein weiterer Unterschied ist dadurch gegeben, daß die Gefäß- und Blutdruckwirkung des Hypertensins nicht wie diejenige der Sympathicomimetica durch *Ergotoxin* abgeschwächt wird. Auch darin stimmt das Hypertensin mit den „Constrictinen" des Blutes überein. Ihr Auftreten ist mit der Blutgerinnung verknüpft. Wie es unter „physiologischen" Verhältnissen *extravasal* unter dem Einfluß des Gerinnungsfermentes Thrombin zur Entstehung der gefäßverengernden „*Constrictine*" kommt, so erfolgt unter pathologischen Verhältnissen unter der Wirkung des in die Blutbahn sezernierten Nierenfermentes Renin *intravasal* die Bildung des blutdrucksteigernden „*Hypertensins*".

Die Natur der „Spätgifte" des Blutes ist im Gegensatz zu derjenigen der gefäßerweiternden und blutdrucksenkenden, in der Hauptsache wohl mit Adenylsäure identischen „Frühgifte[31]" unbekannt. Ihre Identität mit *Tyramin* ist gelegentlich diskutiert worden[31a], ohne daß allerdings bisher überzeugende Beweise vorlägen. Andererseits sprechen Untersuchungen Konscheggs[32], die aber erst noch der Bestätigung bedürfen, für das Bestehen von Beziehungen auch zwischen „Sympathinen" und „Constrictinen" bzw. „Hypertensin". Nach Konschegg soll Adrenalin durch Bindung an Blut- und Organlipoide eine Verstärkung seiner gefäßkonstriktorischen Wirkung und sogar eine qualitative Umkehr seiner darm*lähmenden* in eine darm*erregende* Wirkung erfahren können. Aus „Sympathicomimeticis" entständen auf diese Weise „Constrictine" und „Hypertensine", die dann offenbar normalerweise — vielleicht unter Bindung an Eiweiß — in unwirksamer Form als „Hypertensinogene" im Blut kreisen, und aus denen bei der Blutgerinnung das *Thrombin Constrictine*, bei Erkrankung der Niere das *Renin* blutdrucksteigerndes *Hypertensin* als Wirkstoff der renalen Hypertonie frei machen würde. Für das der Entstehung dieser Stoffe zugrunde liegende *fermentative Geschehen* würde das dann aber bedeuten, daß aminbildende Aminosäuredecarboxylasen, wie Tyrosin- und vor allem Dopadecarboxylase, dem Renin gewissermaßen Handlangerdienste leisten, indem sie das für das Substrat der Reninwirkung erforderliche Rohmaterial, nämlich aromatische Amine als Vorstufen der Sympathine, aus inerten Eiweißbausteinen entstehen lassen. *Der eigentliche Wirkstoff der renalen*

[28] Cannon, W. B. u. A. Rosenblueth: Amer. J. Physiol. **104**, 557 (1933). — [29] O'Connor, K.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **67**, 195 (1912). — [30] Freund, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **86**, 266 (1920); **88**, 39 (1920); **91**, 272 (1921). — [31] Zipf, K. u. E. Wagenfeld: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **150**, 70, 91 (1930). — [31a] Freund, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **180**, 189 (1936). — [32] Konschegg, Th.: Z. exper. Med. **81**, 559 (1932).

Hypertonie wäre somit „Hypertensin“. Eine Bestätigung dieser Auffassung müßten Untersuchungen über vasopressorische Stoffe des *Blutes* bei renalem Hochdruck geben.

Vasopressorische Stoffe des Blutes.

Für die Entwicklung eines chronischen Hochdrucks würden nur *diejenigen* Anteile fermentativ gebildeter sympathicomimetischer Amine und Sympathine Bedeutung gewinnen, die durch Bindung an Lipoide und Eiweiß als „Hypertensinogen“ zum Substrat für Renin werden. Dabei wäre zu berücksichtigen, daß vielleicht *kleine* Mengen der sympathinähnlichen Substanzen, bevor sie diese Bindung eingehen, sich in der *Niere* als der Hauptproduktionsstätte und im *Blute* als solche, d. h. in freier Form nachweisen ließen, und daß die nachweisbaren Mengen bei renal bedingtem Hochdruck infolge gesteigerter fermentativer Bildung erhöht sein könnten. Dafür spricht z. B. der Befund amerikanischer Autoren[33], daß sich aus frischen Hundenieren geringe Mengen einer adrenalinähnlichen Substanz extrahieren lassen, und daß die Ausbeute bei der Verarbeitung ischämischer Nieren größer ist. Im gleichen Sinne dürften die Ergebnisse von Untersuchungen Engers[34] über den als „*Nephrin*“ bezeichneten sympathicomimetischen Stoff aus tierischer Niere und aus menschlichem Blut bei chronischer *Nephritis* und *Nephrosklerose* zu deuten sein. In dieselbe Richtung schließlich würde auch die von Heinsen und Wolf[35] mitgeteilte Beobachtung über das Vorkommen von Tyramin im Blut von Patienten mit renaler Hypertonie weisen.

Die beiden zuletzt genannten Befunde vom Vorkommen sympathicomimetischer Amine im Blut bei bestimmten Formen renaler Hypertonie scheinen jedoch nicht genügend gesichert. Das von Heinsen und Wolf beobachtete Auftreten von Tyramin im Blut nierenkranker Patienten konnte von Nachuntersuchern[36] nicht bestätigt werden, und tierexperimentelle Untersuchungen von Verney[37] machen es unwahrscheinlich, daß Tyramin überhaupt am Zustandekommen des renalen Hochdrucks beteiligt ist. Das gleiche trifft für Adrenalin zu[37]. Die Untersuchungsergebnisse Engers über „Nephrin“ konnten wir an einem allerdings verhältnismäßig kleinen Versuchsmaterial nicht bestätigen; es war uns nicht möglich, in den von uns untersuchten 7 Fällen chronischer Nephritis und in 4 Fällen von Nephrosklerose unter Vergleich mit der entsprechenden Anzahl blutdrucknormaler Fälle die in der Engerschen Arbeit abgebildeten, geringfügigen Blutdrucksteigerungen durch Heparin-Plasmaextrakte nierenkranker Patienten zu reproduzieren. Wir erhielten keine eindeutigen Unterschiede zwischen Hypertoniker- und Normalblut. Demgegenüber geht aus den Arbeiten anderer Autoren hervor, daß die am Frosch- oder Kaninchenohr-Gefäßpräparat nachweisbare vasoconstrictorische Wirksamkeit des Blutes bei renal bedingter Hypertonie regelmäßig größer ist als bei normalem Blutdruck. Houssay[25] zeigte das für das Blut von Hunden mit experimentellem Drosselungshochdruck, Hantschmann[38] und Vogt[39] für das Blut nierenkranker Patienten. Die gefäßverengernde Substanz unterscheidet sich aber in ihrem pharmakologischen Verhalten eindeutig von den Sympathinen und Sympathicomimeticis, indem ihre Wirkung auch am ergo-

[33] Harrison, T. R., A. Blalock u. M. F. Mason: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **35**, 38 (1936). — Prinzmetal, M. u. B. Friedmann: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **35**, 112 (1936). — Harrison, T. R., A. Blaloch, M. F. Mason u. J. Williams: Arch. int. Med. (Am.) **60**, 1052 (1937). — Williams J. R. u. E. B. Grossman: Amer. J. Physiol. **123**, 364; **124**, 83 (1938). — [34] Enger, R. u. F. Dölp: Z. klin. Med. **139**, 542 (1941). — Enger, R. u. W. Jellinghoff: Z. klin. Med. **139**, 572 (1941). — [35] Heinsen, H. A. u. H. J. Wolf: Z. klin. Med. **128**, 213 (1935). — [36] Enger, R. u. H. Arnold: Z. klin. Med. **130**, 725 (1936); **131**, 759 (1937). — [37] Verney, E. B. u. Marthe Vogt: Quart. J. exper. Physiol. **28**, 253 (1938). — [38] Hantschamnn, L.: Klin. Wschr. **1941**, 394. — Z. exper. Med. **96**, 442 (1935). — [39] Vogt, H.: Klin. Wschr. **1938 II**, 1148.

toxinvergifteten Gefäßpräparat, das auf Sympathikusmittel nicht mehr anspricht, erhalten bleibt. Die Ergotoxinfestigkeit ihrer Wirkung stellt sie den O'CONNORschen Constrictinen des Blutes und dem bei der Einwirkung von Renin auf Blut sich bildenden Hypertensin (Tabelle 2) an die Seite. Es gewinnt den Anschein, als komme es

Tabelle 2. *Einfluß von Ergotoxin auf die gefäßverengernde Wirkung des Adrenalins und Hypertensins.*

Froschgefäßpräparat nach LÄWEN-TRENDELENBURG. Durchströmung mit Frosch-Ringer. Injektionen von Adrenalin (ADR) und Hypertensin (Hy) in den mit der Aortenkanüle verbundenen Schlauch.

Die Zahlen bedeuten Tropfen je 30 Sek.

22	19		20	22
21	20	Umschaltung auf Ergotoxin/Ringer. — (Ergotoxinphosphat 1/200000). — Nach 5 Min. erneut Injektion von Adrenalin und Hypertensin.	18	22
22	20		21	22
0,1 ccm ADR 1/500000	0,1 ccm Hy 1/10		0,1 ccm ADR 1/500000	0,1 ccm Hy 1/10
21	18		22	20
13	16		23	20
10	11		21	16
8	10		20	14
8	12		23	13
11	12		—	13

bei der renalen Hypertonie gar nicht zur Entstehung eines spezifischen, neuartigen und bisher blutfremden „Wirkstoffes", sondern nur zum vermehrten Auftreten gefäßwirksamer Stoffe, die nahe Verwandtschaft aufweisen zu schon physiologischerweise im Blut vorhandenen *Constrictinen* und zu *Hypertensin*, dem Produkt der Reninwirkung.

Die *Entstehung* des „Wirkstoffes der renalen Hypertonie", die bei bestimmten Erkrankungen der Niere pathologisch gesteigerte und dadurch zu Hypertonie führende fermentative Hypertensinbildung würde in ihrem *Mechanismus* verständlich durch die „vasopressorische Sekretion" von Renin aus der ischämischen Niere und das Zusammenspiel von Renin und Aminosäuredecarboxylasen, besonders wohl Dopadecarboxylase, wie es im Vorhergehenden dargelegt wurde.

Zusammenfassung.

Die Arbeit versucht einen Beitrag zu liefern zur Aufklärung des *chemisch-humoralen* Mechanismus der renalen Hypertonie. Die menschliche Erkrankung wird zum experimentellen Drosselungshochdruck des Hundes in Parallele gesetzt. In der *Ischämie* des Nierengewebes wird ein für beide Fälle wesentlicher pathogenetischer Faktor erblickt. Die Überlegung, daß die mangelhafte Blut- und Sauerstoffversorgung der Niere sich entscheidend auf die Stoffwechselvorgänge im Gewebe auswirken muß, ließ das Augenmerk vor allem auf *Fermente* der Niere richten, deren Wirkung zur Entstehung blutdrucksteigernder Substanzen in Beziehung steht: 1. auf die in der Nierenrinde lokalisierten *Aminosäuredecarboxylasen*, besonders die Dopadecarboxylase, die durch Abspaltung von Kohlensäure unwirksame

Aminosäuren in pressorisch wirksame Amine überführen; 2. auf das „*Renin*" der Nierenrinde, unter dessen Wirkung es zur Umwandlung eines den Bluteiweißkörpern anhaftenden blutdruckunwirksamen „Hypertensinogens" in ein blutdrucksteigerndes „Hypertensin" kommt.

1. Untersuchungen an nierenkranken Patienten hatten das Ergebnis, daß der Gehalt des Harns an „*Urosympathin*", dem in jedem Harn nachweisbaren Gemisch blutdrucksteigernder sympathicomimetischer Amine, bei *akuter Nephritis* regelmäßig vermindert ist; bei *chronischer Nephritis* und *Nephrosklerose* war der Urosympathingehalt des Harns häufig vermehrt. Die Befunde werden im Sinne einer *Retention* und *Überproduktion* pressorischer Sympathicomimetica gedeutet. Für die Überproduktion wird einerseits eine bei Sauerstoffmangel zu erwartende Verschiebung des physiologischen Gleichgewichts zwischen O_2-*unabhängiger* Decarboxylase und O_2-*abhängiger* Aminoxydase, zwischen Amin*bildung* und *-zerstörung* zur Seite der Aminbildung hin verantwortlich gemacht, andererseits auf Grund von Modellversuchen an mehrere Tage aufbewahrten und mit Kochsalzlösung durchströmten Nieren eine Abgabe der physiologischerweise zellverankerten Decarboxylase durch das ischämische Nierengewebe ans Blut. In der pressorischen Wirksamkeit retinierter und vermehrt gebildeter Sympathine und sympathinähnlicher Substanzen wird jedoch nicht die eigentliche, Hypertonie bewirkende Ursache gesehen. Für den „*Wirkstoff*" der renalen Hypertonie wird das unter der Reninwirkung entstehende *Hypertensin* gehalten.

2. Das Ergebnis von Durchströmungsversuchen an isolierten Nieren weist darauf hin, daß es unter dem Einfluß der Gewebsischämie nicht nur zum Freiwerden von *Dopadecarboxylase*, sondern auch zu einer „vasopressorischen Sekretion" von *Renin* kommt. Auf diese Weise würde ein Zusammentreffen von Ferment und Substrat in der Blutbahn und damit eine Intensitätssteigerung der Fermentwirkung, d. h. eine vermehrte und deshalb blutdrucksteigernde Hypertensinbildung ermöglicht.

Die blutdrucksteigernde Wirkung des Hypertensins wird durch *Cocain* verstärkt, sie bleibt ebenso wie die am Froschgefäßpräparat nachweisbare gefäßverengernde Wirkung unbeeinflußt durch *Ergotoxin* und *Yohimbin*. Hierdurch und durch seine erregende Wirkung am isolierten Darm unterscheidet sich Hypertensin pharmakologisch von *Adrenalin* und anderen sympathicomimetischen Aminen. Das Fehlen der antidiuretischen Wirkungskomponente und der Tachyphylaxie der Kreislaufwirkung unterscheidet es vom *Vasopressin* des Hypophysenhinterlappens. In der Blutdruck- und Gefäßwirkung, im refraktären Verhalten gegenüber Ergotoxin und Yohimbin, sowie in der Erregungswirkung am Darm stimmt Hypertensin pharmakologisch überein mit den normalen *Constrictinen* des Blutes. In der Ergotoxinfestigkeit seiner Blutdruckwirkung gleicht es sodann der gefäßverengernden Substanz, deren vermehrtes

Auftreten im Blut bei renaler Hypertonie übereinstimmend von mehreren Autoren beobachtet wurde.

3. Es wird versucht, *genetische Beziehungen* zwischen Adrenalin und Sympathinen einerseits, Hypertensin und Blutconstrictinen andererseits herzustellen durch die auf Untersuchungen Konscheggs über lipoidgebundenes Adrenalin sich stützende *Hypothese*, daß die Constrictine des Blutes und das Hypertensin der renalen Hypertonie lipoidgebundene Sympathine sind, die durch Lösung aus einer pharmakologisch inaktiven Bindung an Bluteiweißkörper wirksam werden. Den *Aminosäuredecarboxylasen*, insbesondere der Dopadecarboxylase fiele hierbei die Aufgabe zu, durch Decarboxylierung bestimmter aromatischer Eiweißbausteine aminartige Sympathine und damit Ausgangsmaterial für das „Hypertensinogen" des Blutes zu bilden, aus dem dann *Renin*, das zweite der am Zustandekommen der Hypertonie ursächlich beteiligten Fermente, den „Wirkstoff" der renalen Hypertonie — Hypertensin — abzuspalten hätte.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Die Reduktion des Hämiglobins.

III. Mitteilung*.

Reduktion des Hämiglobins und Stoffwechsel in roten Zellen.

Von

MANFRED KIESE und WALTRAUD SCHWARTZKOPFF.

Mit 13 Textabbildungen.

(Eingegangen am 21. September 1944.)

Rote Zellen atmen nur sehr wenig, gären aber verhältnismäßig stark, und zwar auch in Gegenwart von Sauerstoff. Ihnen fehlen die in anderen Zellen vorhandenen Fermentsysteme, die die schnelle Oxydation der verschiedenen Gärungsprodukte durch Sauerstoff ermöglichen. Im Gegensatz zum Sauerstoff vermag jedoch Hämiglobin unter Reduktion zu Hämoglobin durch enzymatische Katalyse Gärungsprodukte zu oxydieren. Die aerobe Gärung der roten Zellen ist also für die Erhaltung des Blutfarbstoffs in der zur Sauerstoffbindung fähigen Ferroform von grundlegender Bedeutung. Eine Analyse der Reduktion des Hämiglobins[1] in den roten Zellen hatte bereits gezeigt, daß nicht allein die bei der Gärung gebildete Milchsäure Hämiglobin reduziert, sondern daß Hämiglobin auch noch auf anderem Wege reduziert wird. Wir haben durch Bestimmung der bei der Reduktion des Hämiglobins gebildeten Verbindungen den Mechanismus der Reduktion des Hämiglobins und ihre Beziehungen zu den Stoffwechselvorgängen in den roten Zellen weiter zu klären versucht. Dabei ergab sich, daß neben den bereits bekannten Reaktionen, nämlich mit Robisonester und mit Milchsäure, noch andere eine Reduktion des Hämiglobins ermöglichen. Von diesen konnte die Reaktion mit Triosephosphat unter Bildung von Brenztraubensäure nachgewiesen und ihr Ablauf bei der Reduktion des Hämiglobins in der Zelle wahrscheinlich gemacht werden. Fumarsäure und Äpfelsäure vermögen ebenfalls Hämiglobin zu reduzieren. Ihre Rolle bei der Reduktion unter physiologischen Bedingungen bedarf noch weiterer Klärung.

Durch spezifische Hemmung der einen oder anderen Reaktion wurde versucht, Kenntnis über den Anteil der Reaktionen an der Reduktion des Hämiglobins im Blute zu erhalten. Danach ist besonders bei den schnell reduzierenden Tierarten (Kaninchen, Meerschweinchen) die Milchsäure das wesentliche Reduktionsmittel, während beim Menschen die Milchsäure gegenüber den anderen Gärungsprodukten zurücksteht.

* I. Mitt. Arch. exper. Path. (D.) **202**, 493 (1943). — II. Mitt. Biochem. Z. **316**, 264 (1944).

[1] KIESE, M.: Biochem. Z. **316**, 264 (1944).

Methoden.

Die Geschwindigkeit der Reduktion des Hämiglobins wurde wie in früheren Untersuchungen durch manometrische Messung[2] der Aufnahme von Kohlenoxyd oder Sauerstoff im Warburg-Apparat bestimmt. Die Flüssigkeitsmenge in Hauptraum und Birne der kegelförmigen Gefäße betrug 3,6 ccm. Das Einsatzgefäß enthielt 0,4 ccm 10%ige Natronlauge und ein in den Gasraum hineinragendes Filterpapierröllchen. Wurde gleichzeitig die Kohlendioxydabgabe gemessen, so wurde Warburgs[3] indirektes Verfahren zur Bestimmung zweier Gase mit verschiedenen Löslichkeitskoeffizienten angewandt. Die Zellen wurden dann in Karbonat-Ringer-Lösung oder in Serum suspendiert. Die Karbonat-Ringer-Lösung hatte folgende Zusammensetzung: 7,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,3 g $CaCl_2$, 0,1 g $MgCl_2$, 2,0 g $NaHCO_3$ im Liter. Je 1 ccm rote Zellen wurde in 2 bzw. 8 ccm Ringer-Lösung oder Serum suspendiert. Beim Waschen der Zellen wurde auf eine möglichst weitgehende Entfernung der weißen Zellen geachtet. Der Gasraum der Gefäße enthielt ein Gemisch von Kohlenoxyd bzw. Sauerstoff mit 1—6% Kohlendioxyd. Für die Messungen der Kohlendioxydfreisetzung sowohl in Karbonat-Ringer-Lösung wie in Serum wurde die Säureretention der roten Zellen wie der roten Zellen + Serum nach Warburg[4] bestimmt und berücksichtigt. Dabei wurde nicht Retention von Kohlensäure angenommen, sondern Retention anderer nicht flüchtiger Säuren. Da die Zellkonzentration in den beiden Gefäßen eines Versuchspaares ungleich war, mußte die Retention für beide gesondert bestimmt werden. In der Messung der Säureretention wurde die Bestimmung der Gesamtkohlensäure manometrisch nach van Slyke[5] durchgeführt. Die manometrische Bestimmung im Warburg-Gefäß ist bei hämoglobinhaltigen Lösungen fehlerhaft, da beim Ansäuern nicht nur CO_2 freigesetzt wird, sondern durch den Bohr-Effekt am Oxyhämoglobin und infolge der in saurer Lösung schnell ablaufenden Hämiglobinbildung auch Sauerstoff.

Bei Abwesenheit von Hämiglobin gären rote Zellen lebhaft sowohl in sauerstoffhaltiger wie -freier Atmosphäre. Die Sauerstoffaufnahme beträgt nur einen Bruchteil der CO_2-Freisetzung aus Karbonat. In Gegenwart von Hämiglobin läuft die Gärung weiter, wenn auch einen anderen Weg. Es werden andere Säuren gebildet. Ferner werden beim Übergang von Hämiglobin in Oxyhämoglobin oder Kohlenoxydhämoglobin Wasserstoffionen gebildet. Ob daneben Kohlendioxyd aus Kohlenhydraten gebildet wird, ist nicht sicher. Wenn es unter besonderen Bedingungen der Fall ist, so kann die Menge nicht genau erfaßt werden.

Glukose im Serum wurde nach Hagedorn-Jensen, Milchsäure nach modifizierter Methode von Fürth-Charnass[5] und Brenztraubensäure

[2] Warburg, O.: Biochem. Z. **142**, 317 (1923). — [3] Warburg, O.: Biochem. Z. **152**, 51 (1924). — [4] Warburg, O.: Biochem. Z. **164**, 481 (1925). — [5] Peters, J. P. and D. D. van Slyke: Quantitative clinical chemistry. Methods. London 1932.

nach Lu[6] bestimmt. Für die Brenztraubensäurebestimmung verwandten wir wie Bueding und Wortis[7] größere Blutmengen (2 ccm).

Wurde Serum oder Plasma ohne Kohlendioxyd im Gasraum verwendet, so wurde es durch Zusatz von NaH_2PO_4 neutralisiert. Alle Messungen wurden bei 37,5° durchgeführt.

Hämiglobin wurde photometrisch nach Evelyn und Malloy[8] und Havemann, Jung und v. Issekutz[9] bestimmt, Hämoglobin nach Oxydation zu Hämiglobin ebenfalls als Hämiglobin.

Versuchsergebnisse.

Reduktion des Hämiglobins in roten Zellen durch Äpfelsäure und Fumarsäure.

In früheren Untersuchungen[1] war bereits nachgewiesen worden, daß Bernsteinsäure Hämiglobin nicht reduziert. Diese Beobachtung wurde bestätigt. Schien somit der über Bernsteinsäure—Fumarsäure—Äpfelsäure—Oxalessigsäure verlaufende Weg der Wasserstoffübertragung, der in anderen Zellen Cytochrom c zu reduzieren vermag, für die Reduktion des Hämiglobins auszufallen, so wurde doch bei späteren Prüfungen verschiedener Verbindungen gefunden, daß Äpfelsäure und Fumarsäure Hämiglobin zu reduzieren vermögen. Beide Säuren waren gleich stark wirksam. Ein Versuch, der die Reduktion des Hämiglobins durch Malat und Fumarat veranschaulicht, ist in Abb. 1 wiedergegeben. Zum Vergleich ist unter gleichen Bedingungen die Reduktion durch Glukose und Laktat durchgeführt worden. Bei einer Konzentration von 0,15% verlief die Reduktion in roten Zellen vom Kaninchen etwa so schnell wie in einer äquimolaren Glukoselösung, während Laktat in äquimolarer Konzentration erheblich schneller reduzierte. Die Reduktion durch Äpfelsäure verlief

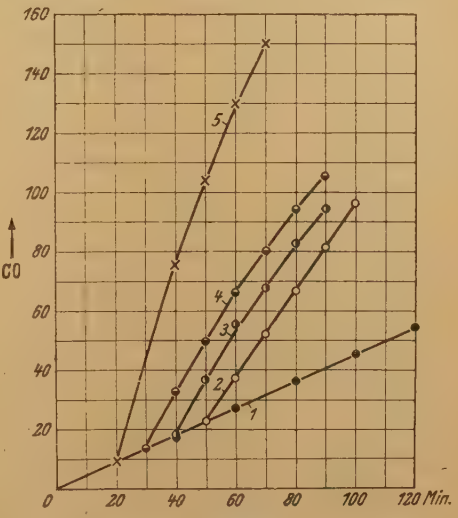


Abb. 1. Reduktion des Hämiglobins in roten Zellen von Kaninchen durch Fumarsäure und Äpfelsäure. 1 ccm rote Zellen mit 21,5% Gesamthämoglobin in Phosphat-Ringer-Lösung. Ordinate: Reduktionsgeschwindigkeit gemessen als CO-Aufnahme des reduzierten Hämoglobins. Kurve 1: Kein Zusatz von Substrat. Kurve 2: Glukose 0,28%. Kurve 3: Malat 0,17%. Kurve 4: Fumarat 0,17%. Kurve 5: Laktat 0,14%. Die Zahlen geben bei den Säuren die Konzentration der Anionen an. Sie wurden als Natriumsalze verwendet. Gasraum CO, Temp. 37,5°.

[6] Lu, G. D.: Biochem. J. **33**, 249 (1939). — [7] Bueding, E. u. H. Wortis: J. biol. Chem. (Am.) **133**, 585 (1940). — [8] Evelyn, K. A. u. H. T. Malloy: J. biol Chem. (Am.) **126**, 655 (1938). — [9] Havemann, R., F. Jung u. B. v. Issekutz jun.: Biochem. Z. **301**, 116 (1939).

unabhängig von der durch Glukose und Milchsäure. So addierte sich einerseits ihre Wirkung zu der der beiden anderen Substrate (Tabelle 1), andererseits konnte die Reduktion durch spezifische Hemmung und Beschleunigung der verschiedenen Reaktionen gegen die anderen abgegrenzt werden. Die Reduktion durch Äpfelsäure wurde nicht durch reversible Farbstoffe beschleunigt. Sie wurde nicht durch Jodessigsäure und auch nicht durch

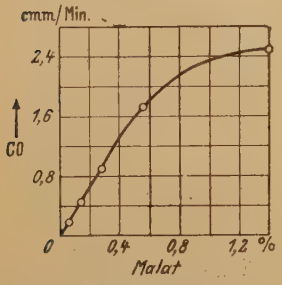


Abb. 2. Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Reduktion des Hämiglobins in roten Zellen des Kaninchens durch Malat von der Malatkonzentration. 1 ccm rote Zellen in Phosphat-Ringer-Lösung p_H 7,3. Temp. 37°, Gasraum CO. Ordinate: Zunahme der Reduktionsgeschwindigkeit nach Zusatz von Malat.

Tabelle 1. *Addition der Reduktion des Hämiglobins durch Malat zu der durch Glukose und der durch Laktat in roten Zellen von Kaninchen. 1,0 ccm rote Zellen mit 26,5% Gesamthämoglobin in Phosphat-Ringer-Lösung. Gasraum CO. Temp. 37,5°. Die Reduktionsgeschwindigkeit ist angegeben als Geschwindigkeit der Kohlenoxydaufnahme und bezieht sich auf die ersten 20 Min. nach Zusatz des Substrates.*

Substrat	Konzentration g in 100 ccm	Reduktionsgeschwindigkeit cmm CO je Min.
1. —	—	0,3
2. Glukose	0,28	1,2
3. Laktat	0,055	1,8
4. Malat	0,17	1,3
5. Glukose +	0,28	
Malat	0,17	2,6
6. Laktat +	0,055	
Malat	0,17	3,3

Malonsäure und Brenztraubensäure gehemmt. Nach Hämolyse vermochte Äpfelsäure Hämiglobin nicht mehr zu reduzieren. Die Abhängigkeit der Reduktionsgeschwindigkeit von der Malatkonzentration ist in Abb. 2 wiedergegeben.

Die Reduktionsgeschwindigkeit nimmt mit steigender Konzentration bis in einen hohen Konzentrationsbereich zu. Eine Sättigung des Fermentsystems wird erst mit höheren Konzentrationen erreicht als bei der Reduktion durch Glukose oder Milchsäure.

Hemmung der Reduktion des Hämiglobins durch Brenztraubensäure und Malonsäure.

Die durch Zusatz von Glukose bewirkte Beschleunigung der Reduktion des Hämiglobins in den roten Zellen kann durch Jodessigsäure völlig aufgehoben werden, während die Reduktion durch Laktat nicht beeinflußt wird (Schapott[10], Kiese[1]). Andererseits konnte durch Brenztraubensäure die Reduktion des Hämiglobins durch Milchsäure gehemmt werden. Die in Abb. 3 wiedergegebenen Versuche zeigen, daß Brenztraubensäure in einer Konzentration von 0,2 Mol pro Liter die Reduktion durch Laktat

[10] Schapott, W. S.: Biochimija 3, 430 (1938).

fast völlig hemmte und daß die Reduktion durch Glukose und Äpfelsäure fast gar nicht beeinträchtigt wurde. Untersuchungen an den roten Zellen vom Meerschweinchen, Pferd und Hund führten zu ganz ähnlichen Ergebnissen. Bei Anwesenheit von Glukose und Laktat wurde durch Brenztraubensäure die Reduktion durch Laktat ebenfalls gehemmt, und es resultierte eine der Reduktion durch Glukose entsprechende Geschwindigkeit. Die katalytische Wirkung reversibler Farbstoffe wurde durch Brenztraubensäure nur sehr wenig beeinflußt.

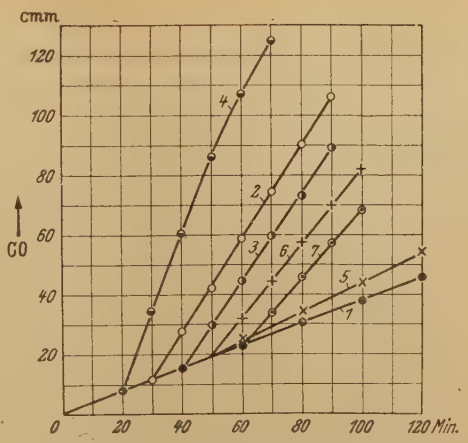


Abb. 3. Einfluß von Pyruvat auf die Reduktion des Hämiglobins durch Glukose und Laktat in roten Zellen vom Kaninchen. 0,5 ccm rote Zellen mit 27% Gesamthämoglobin und 23,5% Hämiglobin in Phosphat-RINGER-Lösung. Kurve 1: Ohne Zusatz von Substrat. Kurve 2: 0,28% Glukose. Kurve 3: 0,28% Glukose + 2,9% Natriumpyruvat. Kurve 4: 0,2% Natriumlaktat. Kurve 5: 0,2% Natriumlaktat + 2,9% Natriumpyruvat. Kurve 6: 0,17% Natriummalat. Kurve 7: 0,17% Natriummalat + 2,9% Natriumpyruvat. Gasraum CO, Temp. 37,5°.

Die Abhängigkeit der Hemmung durch Brenztraubensäure von der Brenztraubensäuekonzentration ist in Abb. 4 wiedergegeben. Sie folgt praktisch einem durch die ausgezogene Kurve wiedergegebenen Massengleichgewicht.

Die Hemmung durch Brenztraubensäure war abhängig von der Milchsäurekonzentration. Bei hoher Milchsäurekonzentration war die Hemmung durch eine bestimmte Brenztraubensäurekonzentration geringer als bei niedriger.

Ähnlich der Brenztraubensäure hemmte Malonsäure in einer Konzentration von 0,2% die Reduktion des Hämiglobins durch Milchsäure, aber nicht die durch Glukose und Äpfelsäure. Wesentlich höhere Konzentrationen (1—3%) hemmten auch die Reduktion durch Glukose.

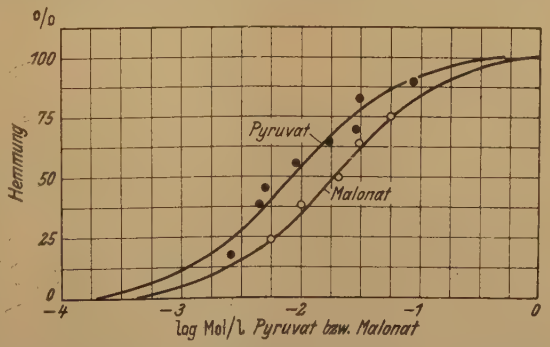


Abb. 4. Hemmende Wirkung des Pyruvats und Malonats auf die Reduktion des Hämiglobins durch Laktat in Abhängigkeit von der Pyruvat- bzw. Malonatkonzentration. 0,5 ccm rote Zellen vom Kaninchen mit 29,2% Gesamthämoglobin und 26,0% Hämiglobin in Phosphat-RINGER-Lösung. Laktat 0,08%. Gasraum CO, Temp. 37,5°. ● Pyruvat; ○ Malonat.

In Abb. 4 sind die Beziehungen zwischen Malonatkonzentration und Hemmung wiedergegeben. Danach ist die für eine bestimmte Hemmung

erforderliche Malonatkonzentration von gleicher Größenordnung wie die gleich wirksame Pyruvatkonzentration. Auch die Hemmung durch Malonsäure war von der Milchsäurekonzentration im gleichen Sinne abhängig wie die Hemmung durch Brenztraubensäure.

Der Einfluß von Jodessigsäure und Brenztraubensäure auf die Reduktion des Hämiglobins im Blute.

Wurden hämiglobinhaltige Zellen statt in Ringer-Lösung in Serum oder Plasma, dessen Gerinnung durch Heparin gehemmt war, suspendiert,

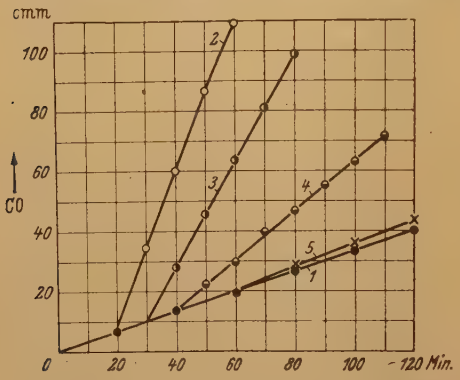


Abb. 5. Einfluß von Jodessigsäure und Brenztraubensäure auf die Reduktion des Hämiglobins im Blute vom Kaninchen. 0,5 ccm rote Zellen mit 30% Gesamthämoglobin und 24% Hämiglobin. Kurve 1: Rote Zellen in Phosphat-Ringer-Lösung ohne Zusatz von Substrat. Kurve 2: Serum mit NaH_2PO_4 neutralisiert. Kurve 3: Serum mit 10^{-3} Mol/l Jodazetat. Kurve 4: Serum mit 0,2 Mol/l Pyruvat. Kurve 5: Serum mit 10^{-3} Mol/l Jodazetat und 0,2 Mol/l Pyruvat. Gasraum CO, Temp. 37,5°.

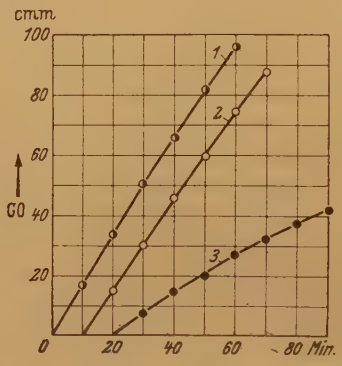


Abb. 6. Einfluß von Brenztraubensäure und Jodessigsäure auf die Reduktion des Hämiglobins im Blute vom Menschen. 1,5 ccm rote Zellen mit 33,5% Gesamthämoglobin und 31,5% Hämiglobin. Kurve 1: Rote Zellen im Serum mit NaH_2PO_4 neutralisiert. Kurve 2: Serum mit 0,2 Mol/l Pyruvat. Kurve 3: Serum mit 10^{-3} Mol/l Jodazetat. Gasraum CO, Temp. 37,5°.

so trat eine Reduktion des Hämiglobins ein wie in Ringer-Lösung mit Glukose und Lactat. Die Geschwindigkeit dieser Reduktion wird unten noch näher erörtert werden. Wurde dem Serum Jodessigsäure oder Brenztraubensäure oder beide zugesetzt, so wurde die Reduktion gehemmt. Der Zusatz beider Säuren in geeigneter Konzentration (0,2 Mol/l Brenztraubensäure und 0,001 Mol/l Jodessigsäure) hemmte in jedem Falle den Einfluß des Serums auf die Reduktion vollständig. Jodessigsäure oder Brenztraubensäure allein hemmten die Reduktion im Blute verschiedener Tiere in sehr verschiedenem Maße. Während Jodessigsäure die Reduktion des Hämiglobins im Kaninchenblute nur sehr wenig oder gar nicht hemmte, verminderte Brenztraubensäure die Reduktionsgeschwindigkeit sehr stark (Abb. 5). Das gleiche Verhältnis der Wirkung war im Meerschweinchenblute zu beobachten. Dagegen erwies sich im Menschenblut Jodessigsäure stärker hemmend als Brenztraubensäure. Diese war in der Konzentration von 0,2 Mol/l fast ohne Einfluß auf die Reduktionsgeschwindigkeit (Abb. 6).

Demnach ist beim Kaninchen und Meerschweinchen das wichtigste Substrat für die Reduktion des Hämiglobins im Blut die Milchsäure, beim Menschen jedoch die Glukose.

Vergleich der Reduktion des Hämiglobins im Serum und in Ringerlösung von entsprechendem Gehalt an Glukose und Milchsäure.

Durch die Versuche, in denen die Reduktion des Hämiglobins im Blute durch Jodessigsäure und Brenztraubensäure gehemmt wurde, war es sehr wahrscheinlich gemacht worden, daß Glukose und Milchsäure die beiden einzigen für die Reduktion gebrauchten Substrate sind. Diese Annahme wurde ganz wesentlich noch durch Versuche gestützt, in denen die Geschwindigkeit der Reduktion im Blute mit der in einer RINGER-Lösung von gleichem Gehalt an Glukose und Milchsäure verglichen wurde.

Nach Abtrennen der Erythrozyten, die dann mit Nitrit behandelt und gewaschen wurden, wurde im Serum der Gehalt an Glukose und Milchsäure bestimmt und dann eine Phosphat-RINGER-Lösung von entsprechender Zusammensetzung hergestellt. Die genaue Gleichheit der Konzentrationen war besonders bei der Milchsäure wichtig, da das entsprechende Ferment bei den im Serum vorhandenen Milchsäurekonzentrationen noch nicht vollständig gesättigt ist und darum auch kleinere Konzentrationsunterschiede die Reduktionsgeschwindigkeit verändern.

Ergebnisse solcher Versuche mit Kaninchen- und Meerschweinchenblut sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Die Reduktionsgeschwindigkeit in der RINGER-Lösung ist der im Serum ganz gleich. Auch die katalytische Wirkung von Farbstoffen ist in RINGER-Lösung gleich stark wie im Serum.

Im Menschenblute, in dessen Erythrozyten im Gegensatz zum Kaninchen- und Meerschweinchenblut die Reduktion des Hämiglobins hauptsächlich durch Glukose erfolgt, verlief die Reduktion des Hämiglobins ebenfalls mit der gleichen Geschwindigkeit wie in RINGER-Lösung von

Tabelle 2. *Reduktion des Hämiglobins in den roten Zellen nach Suspension in Serum und in Phosphat-RINGER-Lösung von gleichem Gehalt an Glukose und Laktat. Serum mit NaH_2PO_4 neutralisiert. Farbstoffkonzentration 0,028%.*

Tierart	Zellmenge in ccm	Hb-Konzentration der Zellen in g je 100 ccm	Gehalt des Serums bzw. RINGER-Lösung in g/100 ccm an		Reduktionsgeschwindigkeit als CO-Aufnahme in cmm/Min.		Farbstoff	Reduktionsgeschwindigkeit in Gegenwart des Farbstoffs	
			Glukose	Laktat	Serum	RINGER-lösung		Serum	RINGER-lösung
Kaninchen	0,5	26,0	0,135	0,070	2,3	2,2	2-Methyl-1,4-Naphthochinon	5,3	5,5
Mensch	1,5	32,0	0,095	0,025	1,1	1,1	Nilblau	12,0	14,0
Meerschweinchen	0,5	25,5	0,170	0,082	1,3	1,4	Nilblau	3,2	3,2

gleichem Gehalt an Glukose und Milchsäure (Tabelle 2). Ebenso war die katalytische Wirkung der Farbstoffe in Serum und RINGER-Lösung gleich stark.

Die Bildung von Wasserstoffionen bei der Reduktion des Hämiglobins.

Die weiter unten beschriebenen Versuche zeigen, daß die Oxydation der Gärungsprodukte durch Hämiglobin in den roten Zellen nur jeweils zu einer um zwei H ärmeren oder ein O reicheren Verbindung führt, und daß eine Oxydation bis zum Kohlendioxyd, wenn überhaupt, nur in sehr geringem Umfange erfolgt. Es war somit anzunehmen, daß das bei der Reduktion des Hämiglobins auftretende Kohlendioxyd ausschließlich durch Wasserstoffionen aus dem Karbonat freigesetzt wurde. Dennoch erschien wahrscheinlich, daß die Kohlendioxydfreisetzung bei der Reduktion durch verschiedene Substrate verschieden sein würde.

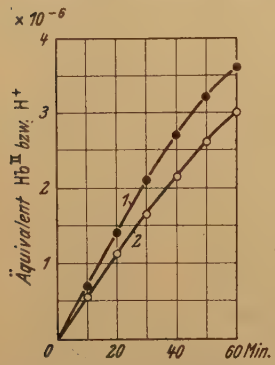


Abb. 7. Bildung von Wasserstoffionen bei der Reduktion von Hämiglobin durch Askorbinsäure in Karbonat-RINGER-Lösung. 0,95 ccm Hämiglobin 12,55% = 7 × 10^{-5} Äquivalente in 3 bzw. 9 ccm Lösung. Askorbinsäurekonzentration 0,1 g/100 ccm. Gasraum CO + 5% CO_2, Temp. 37,5°. Kurve 1: Reduktion des Hämiglobins. Kurve 2: Bildung von Wasserstoffionen.

Bei der Oxydation von Milchsäure zu Brenztraubensäure durch Hämiglobin war keine Freisetzung von Kohlendioxyd zu erwarten, da beide Säuren bei der Wasserstoffionenkonzentration der Untersuchungen fast vollständig dissoziiert sind. Wurde bei der Reduktion des Hämiglobins durch Glukose lediglich der Aldehyd zur Säure oxydiert, so mußten für die Reduktion von zwei Äquivalenten Hämiglobin ein Molekül Kohlendioxyd freigesetzt werden.

Zur richtigen Bewertung der Freisetzung von Kohlendioxyd aus karbonathaltiger Lösung war zu berücksichtigen, daß Kohlenoxydhämoglobin bzw. Oxyhämoglobin, die bei der Reduktion des Hämiglobins unter unseren Versuchsbedingungen entstanden, stärkere Säuren sind als Hämiglobin. Die Reduktion des Hämiglobins führte also an sich schon zu einer Bildung von Wasserstoffionen und damit zur Freisetzung von Kohlendioxyd. Die durch die Reduktion allein gebildeten Wasserstoffionen wurden durch Reduktion des Hämiglobins mit Askorbinsäure bestimmt. In Abb. 7 sind Ergebnisse solcher Messungen dargestellt, aus denen hervorgeht, daß bei der Reduktion von einem Äquivalent Hämiglobin etwa ein Mol Wasserstoffionen gebildet wird. Die Beziehungen zwischen Reduktion des Hämiglobins und Bildung von Wasserstoffionen sind aus der Abbildung leicht abzulesen.

Diese Korrektur wurde bei den Untersuchungen über die Bildung von Wasserstoffionen und Freisetzung von Kohlendioxyd bei der Reduktion von Hämiglobin in roten Zellen berücksichtigt.

Die durch Glykolyse bzw. durch Atmung bedingte Bildung von Kohlendioxyd wurde bei jedem Versuch durch Messung der Kohlendioxydzunahme an Zellen ohne Hämiglobin bestimmt.

Das Ergebnis einer großen Zahl unter verschiedenen Bedingungen und an den roten Zellen verschiedener Tiere durchgeführter Untersuchungen sei an einigen Versuchen demonstriert. Gewaschene rote Zellen gären in RINGER-Lösung auch ohne Zusatz eines Substrates und vermögen auch Hämiglobin langsam zu reduzieren, wenn solches vorhanden ist, da sie nicht auswaschbares Substrat enthalten. Gleichzeitig

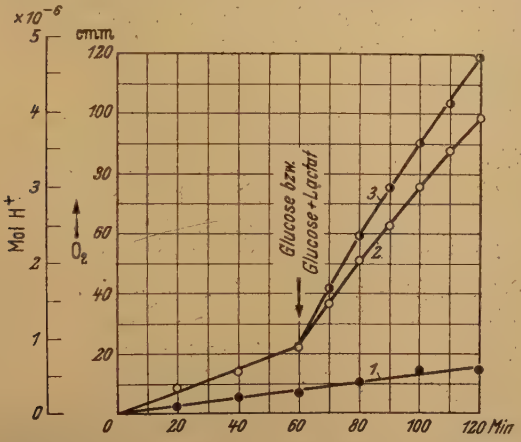


Abb. 8. Atmung und Gärung in roten hämiglobinfreien Zellen vom Meerschweinchen. 1 ccm Zellen mit 30,3% Gesamthämoglobin in Karbonat-RINGER-Lösung. Gasraum O_2 + 5% CO_2, Temp. 37,5°. Kurve 1: Aufnahme von Sauerstoff. Kurve 2: Bildung von Wasserstoffionen nach Zusatz von 0,2 g Glukose auf 100 ccm Lösung. Kurve 3: Bildung von Wasserstoffionen nach Zusatz von 0,2 g Glukose und 0,1 g Laktat auf 100 ccm Lösung. Wenn jedes Wasserstoffion ein CO_2 freisetzte, würden die Kurven der Wasserstoffionenbildung die Freisetzung von CO_2 in dem in der Ordinate angegebenen cmm-Maßstab angeben.

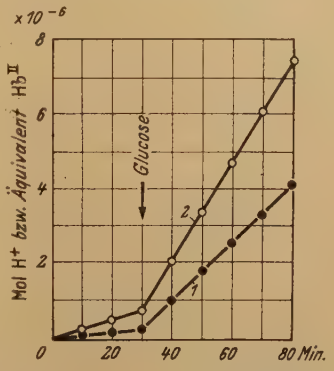


Abb. 9. Bildung von Wasserstoffionen bei der Reduktion von Hämiglobin durch Glukose in roten Zellen vom Meerschweinchen. 1 ccm rote Zellen mit 30,3% Gesamthämoglobin und 24,2% Hämiglobin. Gasraum O_2 mit 5% CO_2, Temp. 37,5°. Kurve 1: Reduktion des Hämiglobins. Kurve 2: Bildung von Wasserstoffionen. Beim Pfeil Zusatz von 0,2 g Glukose auf 100 ccm Lösung.

nehmen sie eine geringe Menge Sauerstoff auf. Zusatz von Laktat beeinflußte weder diese Atmung noch die Gärung. Dagegen trat nach Zugabe von Glukose sofort eine starke Steigerung der Gärung ohne Änderung der O_2-Aufnahme ein (Abb. 8). Gleichzeitiger Zusatz von Laktat hemmte diesen Vorgang nicht. Ein Vergleich mit den in Tabelle 9 wiedergegebenen Messungen der Milchsäurebildung gärender roter Zellen zeigt, daß das Auftreten von Wasserstoffionen im wesentlichen auf die Bildung von Milchsäure zurückzuführen ist.

Hämiglobinhaltige Zellen nahmen nach Zusatz von Glukose O_2 oder die gleiche Menge CO auf und bildeten gleichzeitig eine weit größere Menge Wasserstoffionen. Diese übertraf die O_2- bzw. CO-Aufnahme um die Wasserstoffionenbildung gärender hämiglobinfreier Zellen (Abb. 9). In mehreren Versuchen war die Bildung von Wasserstoffionen sogar noch größer.

Die Reduktion des Hämiglobins durch Milchsäure bildete nur wenig mehr als ein Mol Wasserstoffionen bei der Reduktion eines Äquivalentes Hämiglobin (Abb. 10).

Wurden Laktat und Glukose den roten Zellen zugesetzt, so verlief die Reduktion des Hämiglobins schneller als nach Zusatz von Laktat allein, und die Bildung von Wasserstoffionen überstieg die Reduktion des Hämiglobins deutlich (Abb. 11).

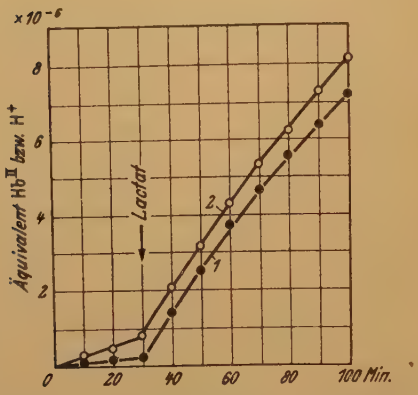


Abb. 10. Bildung von Wasserstoffionen bei der Reduktion von Hämiglobin durch Laktat in roten Zellen vom Meerschweinchen. 1 ccm rote Zellen mit 30,3% Gesamthämoglobin und 24,2% Hämiglobin. Gasraum O_2 mit 5% CO_2, Temp. 37,5°. Kurve 1: Reduktion des Hämiglobins. Kurve 2: Bildung von Wasserstoffionen. Beim Pfeil Zusatz von 0,1 g Na-Laktat auf 100 ccm Lösung.

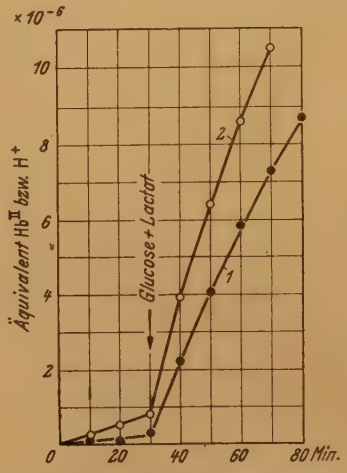


Abb. 11. Bildung von Wasserstoffionen bei der Reduktion des Hämiglobins durch Glukose und Laktat in den roten Zellen vom Meerschweinchen. 1 ccm rote Zellen mit 30,3% Gesamthämoglobin und 24,2% Hämiglobin. Gasraum $O_2 + 5\%$ CO_2. Temp. 37,5°. Kurve 1: Reduktion des Hämiglobins. Kurve 2: Bildung von Wasserstoffionen. Beim Pfeil Zusatz von 0,2 g Glukose und 0,1 g Na-Laktat auf 100 ccm Lösung.

Schließlich ist noch die Wasserstoffionenbildung bei der durch Farbstoffe beschleunigten Reduktion des Hämiglobins zu beschreiben. Auch hier übertraf die Bildung von Wasserstoffionen die CO-Aufnahme beträchtlich (Abb. 12).

Im Serum war die Gärung hämiglobinfreier roter Zellen gleich der in RINGER-Lösung oder nur wenig stärker. Die Reduktion des Hämiglobins verlief etwa gleich schnell wie in RINGER-Lösung mit entsprechender Konzentration von Glukose und Laktat, wie oben ausführlicher belegt wurde. Die Wasserstoffionenbildung übertraf auch hier die O_2- bzw. CO-Aufnahme erheblich. Abb. 13 gibt Ergebnisse entsprechender Messungen an Meerschweinchenblut wieder.

In der vorstehenden Beschreibung der Versuchsergebnisse wurde von Wasserstoffionenbildung bei der Reduktion des Hämiglobins gesprochen. Die Bildung von Wasserstoffionen wurde nicht unmittelbar beobachtet. Bei der Reduktion des Hämiglobins trat im Gasraum Kohlendioxyd auf.

Dieses konnte einerseits durch Decarboxylierung organischer Säuren entstanden oder durch das Auftreten von Wasserstoffionen in der Lösung aus Karbonationen freigesetzt worden sein.

Um den Ursprung des im Gasraum auftretenden Kohlendioxyds aufzuklären, wurde in einer Reihe von Versuchen die bei der Reduktion des Hämiglobins auftretenden Wasserstoffionen auf folgende Weise bestimmt. Ansätze von 10—15 ccm rote Zellen in Karbonat-RINGER-Lösung wurden

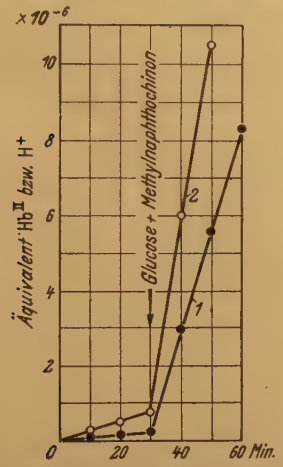


Abb. 12. Bildung von Wasserstoffionen bei der Reduktion des Hämiglobins durch Glukose und 2-Methyl-1,4-Naphthochinon in den roten Zellen vom Meerschweinchen. 1 ccm rote Zellen mit 28,8% Gesamthämoglobin und 27,2% Hämiglobin. Gasraum CO + 5% CO_2, Temp. 37,5°. Kurve 1: Reduktion des Hämiglobins. Kurve 2: Bildung von Wasserstoffionen. Beim Pfeil Zusatz von 0,2 g Glukose und 1,6 mg 2-Methyl-1,4-Naphthochinon in 100 ccm Lösung.

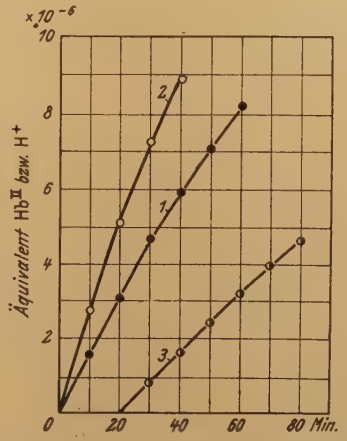


Abb. 13. Reduktion von Hämiglobin und Bildung von Wasserstoffionen in roten Zellen vom Meerschweinchen mit und ohne Hämiglobin im Serum. 1 ccm rote Zellen mit 29,5% Gesamthämoglobin. Gasraum CO+5% CO_2, Temp. 37,5°. Kurve 1: Reduktion von Hämiglobin. Kurve 2: Bildung von Wasserstoffionen bei der Reduktion des Hämiglobins. Kurve 3: Bildung von Wasserstoffionen in hämiglobinfreien Zellen durch Gärung.

in flachen Gefäßen im Wasserbad von 37,5° geschüttelt und mit einem Gemisch von Kohlenoxyd mit 5% Kohlendioxyd durchströmt. Die Strömungsgeschwindigkeit des bei 37,5° mit Wasser gesättigten Gases betrug etwa 1 Liter pro Minute, so daß das gebildete Kohlendioxyd schnell abgeführt wurde. Da der Kohlendioxyddruck dann praktisch konstant war, konnte die Bildung von Wasserstoffionen durch die Verminderung des Karbonatgehaltes der Lösung bestimmt werden. Die Bindung von Wasserstoffionen durch Proteine und andere schwache Elektrolyte wurde ermittelt, indem einem Ansatz eine der beim Versuch auftretenden etwa entsprechende Menge von Wasserstoffionen (0,1 n HCl) zugesetzt und die Abnahme des Karbonatgehaltes bestimmt wurde. Dem anderen Ansatz wurde eine entsprechende Menge von 0,1 Mol NaCl-Lösung zugesetzt. Die im gegebenen Versuch von den Proteinen gebundene Menge Wasserstoffionen konnte dann leicht extrapoliert werden, da die Titrationskurve des

Hämoglobins (p_H-Änderung in Abhängigkeit von der Menge der zugefügten Wasserstoffionen), das neben dem Karbonat im wesentlichen für die Wasserstoffionenbindung in Frage kommt, in dem interessierenden Bereich geradlinig verläuft.

Klare Ergebnisse konnten besonders dort erwartet werden, wo die Gärung sehr gering ist oder die Reduktion des Hämiglobins so schnell verläuft, daß die durch die Milchsäurebildung auftretende Menge Wasserstoffionen im Vergleich zu der Wasserstoffionenbildung durch andere Reaktionen gering ist. Das ist bei der Reduktion des Hämiglobins durch Milchsäure und der durch Farbstoffe katalysierten Reduktion der Fall. Versuchsergebnisse zweier solcher Untersuchungen sind in Tabelle 3 und 4 wiedergegeben. Aus den Daten ist zu entnehmen, daß bei der Reduktion von Hämiglobin durch Milchsäure die Reduktion eines Äquivalentes Hämiglobin 1,2 Mol Wasserstoffionen bildet. Die Wasserstoffionen stammen bei dieser Reaktion also fest ausschließlich vom Hämiglobin. Die Reduktion des Hämiglobins durch Glukose und Farbstoff bildete dagegen 2 Mol Wasserstoffionen bei der Reduktion eines Äquivalents Hämiglobin. Neben dem vom Hämiglobin gebildeten Mol Wasserstoffionen kam also die gleiche Menge noch von einer oder mehreren anderen Reaktionen.

Diese Beobachtungen rechtfertigten die Annahme, daß das im Gasraum auftretende Kohlendioxyd durch Wasserstoffionen aus Karbonat freigesetzt wird.

Tabelle 3. *Bestimmung der Wasserstoffionenbildung bei der Reduktion des Hämiglobins durch Milchsäure in roten Zellen vom Kaninchen.*

A. 11 ccm rote Zellen in Karbonat-RINGER-Lösung + 0,55 ccm 0,1 Mol NaCl. Milchsäurekonzentration 0,18%. Bei 37,5° mit CO + 5% CO_2 ins Gleichgewicht gebracht, Gasraum fortlaufend mit CO + 5% CO_2 durchströmt.

Zeit	Hb Val/l · 10^{-3}	Hb^{III} Val/l · 10^{-3}	CO_2 Mol/l · 10^{-3}
14^{20}	7,7	5,1	12,0
15^{45}	7,8	1,7	10,4
	Differenz	3,4	1,6

B. 2 ccm rote Zellen in Karbonat-RINGER-Lösung — CO_2 Mol/l · 10^{-3}

α) + 0,1 ccm 0,1 Mol NaCl 12,4

β) + 0,1 ccm 0,1 Mol HCl 10,4

Differenz 2,0

Auf Zusatz von $5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l H^+ werden $2,0 \cdot 10^{-3}$ Mol/l CO_2 freigesetzt. Somit entspricht die Freisetzung von $1,6 \cdot 10^{-3}$ Mol/l CO_2 bei der Reduktion des Hämiglobins der Bildung von $4,0 \cdot 10^{-3}$ Mol/l H^+. Bei der Reduktion von $3,4 \cdot 10^{-3}$ Äquivalent je 1 Hämiglobin wurden also $4,0 \cdot 10^{-3}$ Mol/l H^+ gebildet, d. h. 1,2 Wasserstoffionen bei der Reduktion eines Äquivalents Hämiglobin.

Tabelle 4. *Bestimmung der Wasserstoffionenbildung bei der Reduktion von Hämiglobin durch Glukose und 2-Methyl-1,4-Naphthochinon in roten Zellen von Kaninchen.*

A. 14 ccm rote Zellen in Karbonat-RINGER-Lösung + 1,4 ccm 0,1 Mol NaCl bei 37° mit CO + 5% CO_2 ins Gleichgewicht gebracht. Gasraum fortlaufend mit CO + 5% CO_2 durchströmt.

Zeit	Hb Val/l · 10^{-3}	Hb^{III} Val/l · 10^{-3}	CO_2 Mol/l · 10^{-3}
16^{45}	7,4	6,64	11,95
16^{46}	Zusatz von 30 mg Glukose + 0,5 mg 2-Methyl-1,4-Naphthochinon		
17^{30}	7,6	0,54	8,05
	Differenz	6,1	3,9

B. 2 ccm rote Zellen in Karbonat-RINGER-Lösung — CO_2 Mol/l · 10^{-3}

α) + 0,2 ccm 0,1 Mol NaCl 10,1

β) + 0,2 ccm 0,1 Mol HCl 6,9

Differenz 3,2

Auf Zusatz von $10 \cdot 10^{-3}$ Mol/l H werden $3{,}2 \cdot 10^{-3}$ Mol/l CO_2 freigesetzt. Somit entspricht die Freisetzung von $3{,}9 \cdot 10^{-3}$ Mol/l CO_2 bei der Reduktion des Hämiglobins der Bildung von $12{,}2 \cdot 10^{-3}$ Mol/l H^+. Bei der Reduktion von $6{,}1 \cdot 10^{-3}$ Val/l Hämiglobin wurden also $12{,}2 \cdot 10^{-3}$ Mol/l Wasserstoffionen gebildet, d.h. 2 Wasserstoffionen bei der Reduktion eines Äquivalents Hämiglobin.

Bildung von Milchsäure und Brenztraubensäure bei der Reduktion des Hämiglobins.

Endprodukt der Gärung der hämiglobinfreien Zellen ist Milchsäure. Diese vermag Hämiglobin zu reduzieren unter Bildung von Brenztraubensäure (WENDEL[11]). Verhältnismäßig übersichtlich läßt sich diese Reaktion verfolgen, wenn hämiglobinhaltigen Zellen Laktat zugesetzt und die Abnahme der Milchsäure und des Hämiglobins sowie die Bildung von Brenztraubensäure verfolgt wurde. In ERLENMEYER-Kolben, die im Wasserbad von 37,5° geschüttelt wurden, wurden rote Zellen in Karbonat-RINGER-Lösung oder Serum unter einem Gemisch von O_2 mit 5% CO_2 oder CO mit 5% CO_2 gehalten. In geeigneten Zeitabständen wurden Proben zur Bestimmung der Konzentration des Hämiglobins, der Glukose, Milchsäure und Brenztraubensäure entnommen. In der Tabelle 5 sind zwei Versuche mit roten Zellen vom Kaninchen wiedergegeben, bei denen Milchsäure Reduktionsmittel war. Während der Reduktion des Hämiglobins nahm die Milchsäurekonzentration ab und die Brenztraubensäurekonzentration etwa entsprechend zu. Daß die Zunahme der Brenztraubensäure tatsächlich etwas größer war, ist auf Brenztraubensäurebildung aus dem nicht auswaschbaren Substrat der roten Zellen zurückzuführen. Bei der Reduktion von 2 Äquivalenten Hämiglobin verschwand rund ein Mol Milchsäure, und

[11] WENDEL, W. B.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **28**, 401 (1930). — J. biol. Chem. (Am.) **102**, 373, 385 (1932).

Tabelle 5. *Änderung der Hämiglobin-, Milchsäure- und Brenztraubensäurekonzentration bei der Reduktion von Hämiglobin in roten Zellen vom Kaninchen durch Laktat.* Rote Zellen in Karbonat-RINGER-Lösung. Gasraum CO + 5% CO_2. Temp. 37,5°.

Zeit	Hämiglobin		Milchsäure		Brenztraubensäure	
Min.	g/100 ccm	Äquivalent je l · 10^{-3}	mg/100 ccm	Mol/l · 10^{-3}	mg/100 ccm	Mol/l · 10^{-3}
			A. Gesamthämoglobingehalt 14,2%.			
0	9,8	5,8	53,8	6,0	2,6	0,3
60	4,8	2,8	43,2	4,8	17,1	1,9
90	3,6	2,1	40,4	4,5	21,0	2,4
			B. Gesamthämoglobingehalt 13,9%.			
0	11,3	6,84	66,5	7,4	11,7	1,33
60	5,33	3,13	52,8	5,9	29,3	3,33

ein Mol Brenztraubensäure wurde gebildet. In roten Zellen des gleichen Tieres, dessen Hämoglobin nicht oxydiert worden war, blieb die Milchsäurekonzentration unverändert. In 90 Min. wurden $0{,}15 \cdot 10^{-3}$ Mol/l Brenztraubensäure gebildet.

Die Reduktion des Hämiglobins durch Glukose lieferte ebenfalls Brenztraubensäure als Oxydationsprodukt. In Tabelle 6 sind Daten über die Gärung hämiglobinfreier roter Zellen vom Meerschweinchen sowie über die Reduktion des Hämiglobins zusammengestellt. In 145 Min. bildeten hämiglobinfreie Zellen $4{,}6 \cdot 10^{-3}$ Mol/l Milchsäure und $0{,}7 \cdot 10^{-3}$ Mol/l Brenztraubensäure. Hämiglobinhaltige Zellen gleicher Konzentration reduzierten in derselben Zeit $4{,}7 \cdot 10^{-3}$ Äquivalent/l Hämiglobin und bildeten dabei $2 \cdot 10^{-3}$ Mol/l Brenztraubensäure. Die Konzentration der Milchsäure blieb unverändert. Reduktion des Hämiglobins und Bildung von Brenztraubensäure waren etwa äquivalent, wenn man annimmt, daß beim Abbau des Kohlenhydrats zu Brenztraubensäure nur eine Dehydrierung mit Abgabe von zwei Wasserstoffatomen stattfindet. Beachtenswert ist, daß in den hämiglobinhaltigen Zellen die Milchsäurekonzentration

Tabelle 6. *Gärung und Reduktion des Hämiglobins in roten Zellen vom Meerschweinchen in Karbonat-RINGER-Lösung. Glukosekonzentration 180 mg/100 ccm. Temperatur 37,5°. Gasraum CO + 5% CO_2.*

Zeit	Hämiglobinfreie Zellen * Gesamthämoglobin 15,2% = $8{,}95 \cdot 10^{-3}$ Äquivalent/l		Hämiglobinhaltige Zellen Gesamthämoglobin 15,0% = $8{,}83 \cdot 10^{-3}$ Äquivalent/l		
Min.	Milchsäure Mol/l · 10^{-3}	Brenztraubensäure Mol/l · 10^{-3}	Hämiglobin Äquivalent/l · 10^{-3}	Milchsäure Mol/l · 10^{-3}	Brenztraubensäure Mol/l · 10^{-3}
0	0,9	0,1	6,3	0,09	0,5
30	1,4	0,2	5,4	0,05	0,9
75	2,8	0,4	4,3	0,03	1,2
145	5,5	0,8	1,6	0,05	2,5

* Zellen mit nur dem normalen Hämiglobingehalt.

Tabelle 7. *Gärung der roten Zellen von Katzen in Karbonat-*RINGER*-Lösung vor (A) und nach (B) Reduktion von Hämiglobin. Gesamthämoglobin 13,5% = 7,95 · 10^{-3} Äquivalent/l. Glukose 150 mg/100 ccm. Temp. 37,5°. Gasraum CO + 5% CO_2.*

In den Zellen B war durch Nitrit Hämiglobin gebildet worden. Dies wurde nach Suspension der Zellen in Serum und Zusatz von Glukose, Laktat und Nilblau reduziert. Dann wurden die Zellen wieder dreimal gewaschen und zum Gärversuch verwendet.

Rote Zellen	Milchsäurebildung Mol/l/Std. · 10^{-3}	Brenztraubensäurebildung Mol/l/Std. · 10^{-3}
A	1,3	0,03
B	1,5	0

nicht zunimmt. In anderen Versuchen wurde eine kleine Menge Milchsäure gebildet, aber nicht annähernd so viel wie in den hämiglobinfreien Zellen. Diese Hemmung war nicht durch eine Schädigung der Zellen durch die Behandlung mit Nitrit zur Bildung von Hämiglobin bedingt, denn nach der Reduktion des Hämiglobins gärten die Zellen wieder wie die nicht mit Nitrit behandelten hämiglobinfreien (Tabelle 7). Die in den hämiglobinhaltigen Zellen statt der Milchsäure gebildete Brenztraubensäure entspricht der Menge nach nicht der Milchsäurebildung der hämiglobinfreien Zellen, sondern ist weit geringer. Das Hämiglobin hemmt also die Gärung der roten Zellen.

In früheren Untersuchungen war gezeigt worden, daß eine Reihe von Farbstoffen die Reduktion des Hämiglobins beschleunigt und daß diese Wirkung sich nur auf die Reduktion des Hämiglobins durch Glukose oder Fruktose, nicht aber auf die Reduktion durch Milchsäure erstreckt. Die Messung der Bildung von Milchsäure und Brenztraubensäure bei der katalysierten Reduktion ergab, daß diese Reaktion noch einen anderen Weg läuft als die nicht katalysierte. Die Daten der Tabelle 8 wurden mit Zellen des gleichen Blutes wie die der Tabelle 6 gewonnen. In Gegenwart des Farbstoffs verlief die Reduktion des Hämiglobins sehr schnell. In 75 Min. wurde das gesamte Hämiglobin, $5{,}5 \cdot 10^{-3}$ Äquivalent/l, reduziert. Milchsäure wurde nicht angereichert, solange Hämiglobin in den Zellen war. Ebenso wie bei der nicht katalysierten Reduktion wurde

Tabelle 8. *Bildung von Milchsäure und Brenztraubensäure bei der mit Nilblau beschleunigten Reduktion von Hämiglobin in roten Zellen des Meerschweinchens in Karbonat-*RINGER*-Lösung. Gesamthämoglobin 13,5% = 7,95 · 10^{-3} Äquivalent/l. Glukosekonzentration 180 mg/100 ccm. Nilblaukonzentration 3 mg/100 ccm = 6 · 10^{-5} Mol/l. Temp. 37,5°. Gasraum CO + 5% CO_2.*

Zeit Min.	Hämiglobin Äquivalent/l · 10^{-3}	Milchsäure Mol/l · 10^{-3}	Brenztraubensäure Mol/l · 10^{-3}
0	5,5	0,3	0,5
30	2,9	—	0,9
75	0	0,3	1,2
145	0	5,6	1,2

Tabelle 9. *Gärung und Reduktion des Hämiglobins in den roten Zellen verschiedener Tiere. Die Zellkonzentration ist in allen Versuchen sehr ähnlich, der Gesamthämoglobingehalt schwankt zwischen 14 und 15%, das entspricht einer Zellkonzentration von etwa 5 Millionen im cmm. Die Hämiglobinkonzentration zu Beginn der Reduktion betrug 10—14%, nur beim Versuch 3 war sie geringer. Temp. in allen Versuchen 37,5. Die Zahlen der Tabelle bedeuten bei Milchsäure und Brenztraubensäure Zunahme der Konzentration und beim Hämiglobin Abnahme der Konzentration. Die Farbstoffkonzentration betrug 3 mg/100 ccm.*

Nr.	Tierart	Medium	Gasraum	Hämiglobinfreie Zellen		Hämiglobinhaltige Zellen			Hämiglobinhaltige Zellen mit Farbstoff			Farbstoff	Milchsäure nach Beendigung der Hb^{III} Reduktion Mol/l je Std. $\cdot 10^{-3}$
				Milchsäure Mol/l je Std. $\cdot 10^{-3}$	Brenztraubensäure Mol/l je Std. $\cdot 10^{-3}$	Hämiglobin Äquivalent/l je Std. $\cdot 10^{-3}$	Milchsäure Mol/l je Std. $\cdot 10^{-3}$	Brenztraubensäure Mol/l je Std. $\cdot 10^{-3}$	Hämiglobin Äquivalent/l je Std. $\cdot 10^{-3}$	Milchsäure Mol/l je Std. $\cdot 10^{-3}$	Brenztraubensäure Mol/l je Std. $\cdot 10^{-3}$		
1	Kaninchen	Karbonat-RINGER-Lsg.	O_2+5% CO_2	1,5	0,07	2,15	0,1	0,7	—	—	—	—	—
2	Kaninchen	0,180% Glukose	CO+5% CO_2	1,7	0,05	3,3	1,2	0,4	9,0	0,3	0,35	Kresylblau	2,1
3	Kaninchen	Serum	CO+5% CO_2	1,7	0,03	1,7	0,1	0,7	$> 2,4$	0,1	0,6	Kresylblau	1,3*
4	Meerschw.	Karbonat-RINGER-Lsg.	CO+5% CO_2	1,6	0,13	1,1	0,3	0,5	5,2	0,2	0,44	Kresylblau	2,2
5	Meerschw.	0,180% Glukose	CO+5% CO_2	1,7	0,07	1,3	0,5	0,6	7,0	0,6	0,7	Kresylblau	1,0
6	Meerschw.	Serum	CO+5% CO_2	1,2	0,15	1,0	0	0,5	5,6	0,5	0,55	Nilblau	1,0
7	Katze	Karbonat-RINGER-Lsg.	O_2+5% CO_2	1,3	0,08	0,3	—	0,17	—	—	—	—	—
8	Katze	0,180% Glukose	CO+5% CO_2	1,1	0,07	0,4	1,0	0,2	—	—	—	—	—
9	Mensch	Karbonat-RINGER-Lsg.	CO+5% CO_2	0,9	0,06	0,5	1,0	0,25	6,7	0,9	0,21	Kresylblau	1,3
10	Mensch	0,180% Glykose	CO+5% CO_2	0,9	0,08	0,5	1,0	0,27	6,1	1,1	0,39	Kresylblau	—

* Im Versuch 3 betrug die Hämiglobinkonzentration nur 4% $= 2{,}35 \cdot 10^{-3}$ Äquivalent/l. Da die Reduktion des Hämiglobins bei niedrigen Hämiglobinkonzentrationen langsam verläuft, sind die angegebenen Reduktionsgeschwindigkeiten mit denen der anderen Versuche nicht vergleichbar.

Brenztraubensäure gebildet, und zwar die gleiche Menge, in 75 Min. $0{,}7 \cdot 10^{-3}$ Mol/l (vgl. Tabelle 6 und 8). Während bei der unkatalysierten Reduktion die Zunahme der Brenztraubensäurekonzentration die Annahme zuläßt, daß die Bildung von Brenztraubensäure die Oxydationsreaktion ist, die die Reduktion des Hämiglobins durchführt, genügt bei der katalysierten Reduktion die Bildung von Brenztraubensäure nicht für die Reduktion des Hämiglobins. In 75 Min. wurden $5{,}5 \cdot 10^{-3}$ Äquivalent/l Hämiglobin reduziert, aber nur $0{,}7 \cdot 10^{-3}$ Mol/l Brenztraubensäure gebildet.

Nachdem die Reduktion des Hämiglobins beendet war, setzte eine starke Milchsäurebildung ein, die weit größer war als in Zellen, die kein Hämiglobin enthalten hatten. Diese bildeten in 145 Min. $4{,}6 \cdot 10^{-3}$ Mol/l Milchsäure, jene sogar etwas mehr, $5{,}3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, in nur 70 Min. Offenbar hat sich bei der Reduktion des Hämiglobins ein Stoff angereichert, der schneller als Glukose zu Milchsäure abgebaut werden kann.

Die aus den Versuchen der Tabelle 6 und 8 gewonnenen Ergebnisse wurden durch andere Versuche bestätigt. Eine Reihe solcher Versuche ist in der Tabelle 9 zusammengestellt. Die Reduktionsgeschwindigkeiten des Hämiglobins im Versuch 3 sind mit den anderen nicht unmittelbar vergleichbar, da die Hämiglobinkonzentration niedrig und damit die Reduktionsgeschwindigkeit geringer war. Beim Vergleich der einzelnen Tierarten fällt auf, daß die Gärungsgeschwindigkeit der roten Zellen sehr ähnlich, dagegen die Reduktion des Hämiglobins durch Glukose sehr verschieden ist. So ist die Gärung der Kaninchenzellen nur etwa 50% stärker als die der Katzenzellen. Die Geschwindigkeit der Reduktion des Hämiglobins ist aber 600—700% höher. In den roten Zellen von Meerschweinchen, Katze und Mensch wird bei der Reduktion des Hämiglobins eine äquivalente Menge Brenztraubensäure gebildet, in den Zellen des Kaninchens ist die Bildung von Brenztraubensäure jedoch geringer. In Gegenwart von Hämiglobin ist die Milchsäurebildung in den Zellen vom Kaninchen und Meerschweinchen gehemmt, in denen der Katze und des Menschen aber so stark wie in den hämiglobinfreien Zellen. Übereinstimmend bei allen Tieren führt die Beschleunigung der Reduktion des Hämiglobins durch Farbstoffe nicht zu einer Vermehrung der Brenztraubensäurebildung. Sie entspricht vielmehr jeweils der Brenztraubensäurebildung bei der nicht beschleunigten Reduktion.

Besprechung.

Die Versuche über die Reduktion des Hämiglobins durch Äpfelsäure und Fumarsäure zeigen einen weiteren Weg der Reduktion des Hämiglobins in den roten Zellen auf. Hemmungs- und Beschleunigungsversuche erweisen ihn als unabhängig von der Reduktion durch Glukose und Milchsäure. Seine Bedeutung für die Reduktion in vivo ist noch nicht ganz sicher zu beurteilen. Mehrere Beobachtungen und Überlegungen sprechen

immerhin dafür, daß die Reduktion des Hämiglobins durch Äpfelsäure oder Fumarsäure keine große Rolle spielt. Einerseits verläuft die Reaktion ziemlich langsam, und es sind hohe Konzentrationen von Äpfelsäure erforderlich, um die Geschwindigkeit der Reduktion durch Glukose zu erreichen. Andererseits wird durch Glukose und Milchsäure in Konzentrationen, wie sie im Serum vorhanden sind, die gleiche Reduktionsgeschwindigkeit erreicht wie im Serum. Daß Äpfelsäure das in den Zellen vorhandene nicht auswaschbare Substrat ist, ist unwahrscheinlich, denn Äpfelsäure kann die Zellmembran durchdringen. Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration wie die einfache Addition dieser Reaktion zur Reduktion durch Glukose und Milchsäure sprechen dafür, daß die Äpfelsäure nicht eine katalytische Wirkung auf eine andere Reaktion ausübt, sondern selbst als Reduktionsmittel dient.

Die Reduktion des Hämiglobins durch Äpfelsäure und Fumarsäure erscheint noch interessant im Vergleich zur Reduktion des Cytochroms c durch die C_4-Dicarbonsäuren, die v. SZENT-GYÖRGYI[12] besonders entwickelt hat. Cytochrom c wird von Bernsteinsäure durch ein geeignetes Ferment reduziert, aber nicht durch Äpfelsäure und Fumarsäure. Dagegen wird Hämiglobin nicht von Bernsteinsäure, wohl aber von Äpfelsäure und Fumarsäure reduziert. Die Unterschiede sind freilich in Verschiedenheiten der dehydrierenden Fermente zu suchen. Überdies ist es möglich, daß den roten Zellen die Bernsteinsäuredehydrase überhaupt fehlt.

Der Nachweis der spezifischen hemmenden Wirkung der Brenztraubensäure und Malonsäure auf die Reduktion des Hämiglobins durch Milchsäure erlaubte zunächst, die schon auf Grund früherer Untersuchungen angenommene Unabhängigkeit der Reduktion des Hämiglobins durch Glukose und Milchsäure weiter zu stützen. Das ist besonders darum von Bedeutung, weil beide Reaktionen zu dem gleichen Endprodukt Brenztraubensäure führen. Die Brenztraubensäure kann bei der Reduktion durch Glukose also nicht aus Milchsäure entstehen.

Durch die gemeinsame Wirkung von Brenztraubensäure und Jodessigsäure wurden die im Serum vorhandenen Substrate der Reduktion des Hämiglobins ganz ausgeschaltet. Andererseits wurde in RINGER-Lösung mit einer Glukose- und Laktatkonzentration entsprechend der des Serums die gleiche Reduktionsgeschwindigkeit erreicht wie im Serum. Milchsäure und Glukose — genauer gesagt, bei der Vergärung der Glukose gebildete Zwischenprodukte — sind also die wesentlichsten Substrate der Reduktion des Hämiglobins. Wenn andere überhaupt noch mitwirken, ist ihr Anteil an der Reduktion sicher kleiner als 10%.

Durch die Hemmung einerseits der Reduktion durch Milchsäure und andererseits der durch Glukose war es auch möglich, den Anteil der beiden

[12] SZENT-GYÖRGYI, A. VON: Studies on biological oxidation and some of its catalysts. Budapest 1937.

Reaktionen an der Reduktion im Serum abzuschätzen. Danach erfolgt im Blute von Kaninchen und Meerschweinchen die Reduktion des Hämiglobins ganz überwiegend durch Milchsäure, während im Menschenblute der Glukose der größere Anteil zufällt. Diese Feststellungen bestätigen Schlüsse, die man aus Messungen der Reduktion des Hämiglobins durch Glukose und durch Milchsäure in den roten Zellen verschiedener Tiere ziehen konnte. Zu diesen Untersuchungen[13] erlauben die neuen Versuche eine Ergänzung. Beim Vergleich der Reduktionsgeschwindigkeit in vivo mit der durch Addition von Glukose und Laktat in vitro erreichten wurde damals beim Kaninchen und Meerschweinchen in vitro eine geringere Geschwindigkeit als in vivo errechnet. Diese Abweichung ist darauf zurückzuführen, daß bei den Versuchen in vitro Milchsäure in einer Konzentration von 20 mg/100 ccm angewandt wurde, während die Konzentration im Blute dieser Tiere 50—100 mg/100 ccm beträgt.

Die Reduktion des Hämiglobins durch Milchsäure ist offenbar eine verhältnismäßig einfache Reaktion. Durch die Milchsäuredehydrase der roten Zellen, die jedoch ein kompliziertes Systen sein kann, wird die Milchsäure zu Brenztraubensäure dehydriert und das Ferment wiederum von Hämiglobin oxydiert. Brenztraubensäure wird in einer der Reduktion des Hämiglobins äquivalenten Menge gefunden. Von jedem Äquivalent Hämiglobin wird nur ein Wasserstoffion gebildet. Dagegen ist die Reduktion des Hämiglobins durch Glukose ein verwickelter Vorgang, der mehrere Wege gehen kann. Die Zellen verschiedener Tiere bilden bei der Reduktion des Hämiglobins durch Glukose eine äquivalente Menge Brenztraubensäure. Es liegt nahe anzunehmen, daß auch hier die durch Gärung gebildete Milchsäure das eigentliche Reduktionsmittel ist. Dagegen steht aber die oben bereits hervorgehobene Tatsache, daß Brenztraubensäure und Malonsäure die Reduktion durch Glukose nicht hemmen wie die durch Milchsäure. In mehreren Versuchen der Reduktion von Hämiglobin durch Glukose war die Milchsäurekonzentration sehr niedrig, so daß sie die Reduktion des Hämiglobins nicht so schnell durchführen konnte wie Glukose. Wenn somit die Brenztraubensäurebildung über Milchsäure unwahrscheinlich ist, muß die Oxydation an einer anderen Stelle des Gärungsablaufs stattfinden. Dafür käme die Oxydation des phosphorylierten Glyzerinaldehyds zur Glyzerinsäure in Frage. Die Glycerinsäure liefert dann unter Abspaltung von Wasser Brenztraubensäure.

Auf einen anderen Weg der Reduktion des Hämiglobins durch Glukose weisen die Versuche mit roten Zellen vom Kaninchen. Diese bildeten zwar auch Brenztraubensäure, aber nicht in äquivalenter Menge, sondern weniger. Ein Abbau von Brenztraubensäure findet in einem merklichen Ausmaß nicht statt, wie auch der Nachweis einer äquivalenten Brenz-

[13] Kiese, M. u. B. Weis: Arch. exper. Path. (D.) 202, 493 (1943).

traubensäurebildung bei der Reduktion durch Milchsäure beweist. Neben der Reduktion des Hämiglobins, die zur Bildung von Brenztraubensäure führt, läuft wahrscheinlich noch eine Reaktion, die ein anderes Produkt liefert. Diese Reaktion ist es auch, die von Farbstoffen beschleunigt wird. Bei der Reduktion von Hämiglobin durch Glukose in Gegenwart katalysierender Farbstoffe wird nur ebensoviel Brenztraubensäure gebildet, wie in der gleichen Zeit ohne Farbstoff entsteht. Die ohne Farbstoff verlaufende Reaktion läuft also in Gegenwart des Farbstoffes unverändert weiter und wird von dem Farbstoff auch nicht beschleunigt. Der Farbstoff muß vielmehr in ein System eingeschaltet werden, das nicht Brenztraubensäure liefert. Die durch den Farbstoff beschleunigte Reaktion bildet zwei Wasserstoffionen bei der Reduktion eines Äquivalents Hämiglobin. Ein Wasserstoffion wird vom Hämiglobin abgegeben, das andere entsteht wahrscheinlich durch Oxydation eines Aldehyds zur Säure. Da aber zur Oxydation eines Aldehyds zwei Äquivalente Hämiglobin erforderlich sind, muß noch eine andere Wasserstoffionen liefernde Reaktion gleichzeitig ablaufen. Das könnte die Phosphorylierung eines Zuckers sein, da Hexosephosphorsäure stärker dissoziiert als Phosphorsäure. Auf die Entstehung derartiger Verbindungen weist auch die starke Gärung nach Beendigung der Reduktion des Hämiglobins hin.

Die in den Zellen der einzelnen Tiere sehr verschiedene Reduktionsgeschwindigkeit des Hämiglobins beruht weit weniger auf Unterschieden in der Geschwindigkeit der die eigentlichen Reduktionssubstrate liefernden Reaktionen als Unterschieden in der Konzentration an den Hämiglobin reduzierenden Fermenten. Denn die Gärungsgeschwindigkeit in verschiedenen roten Zellen ist sehr ähnlich, aber die Geschwindigkeit der Reduktion des Hämiglobins weicht bei den einzelnen Tierarten sehr stark ab.

In den roten Zellen, die Hämiglobin nur langsam reduzieren, läuft offenbar die Gärung bei Anwesenheit von Hämiglobin unverändert weiter. In den Zellen, die Hämiglobin schnell reduzieren, gewinnt dies jedoch Einfluß auf die Gärung. Es kommt nicht zu einer Anreicherung von Milchsäure. Das beruht nicht auf einer schnellen Oxydation der Milchsäure zu Brenztraubensäure. Denn dann müßte statt der Milchsäure eine entsprechende Konzentration Brenztraubensäure in den Zellen vorhanden sein. Tatsächlich ist aber die Brenztraubensäurekonzentration weit geringer. Durch das Hämiglobin wird der Stoffwechsel auf andere Wege geleitet, so daß die Milchsäurebildung gering ist. Auch die bei der Reduktion des Hämiglobins durch Glukose auftretende Brenztraubensäure entsteht nur zu einem kleinen Teil aus Milchsäure. Der Einfluß des Hämiglobins auf den Stoffwechsel der roten Zellen ist also dem Pasteur-Effekt der atmenden Zellen ähnlich und bietet ein einfaches Modell dieses Phänomens.

Zusammenfassung.

Außer Glukose und Milchsäure vermögen auch Fumarsäure und Äpfelsäure Hämiglobin in roten Zellen zu reduzieren. Die Reaktion ist selbstständig und hat keine Beziehung zur Reduktion durch Glukose oder Milchsäure.

Die Reduktion des Hämiglobins durch Milchsäure wird durch Brenztraubensäure und Malonsäure gehemmt in Konzentrationen, die die Reduktion des Hämiglobins durch Glukose nicht beeinflussen.

In Ringer-Lösung mit denen des Serums entsprechenden Konzentrationen von Milchsäure und Glukose wird Hämiglobin ebenso schnell reduziert wie im Serum. Durch Brenztraubensäure, die die Reduktion des Hämiglobins durch Milchsäure hemmt, und Jodessigsäure, die die Hämiglobinreduktion durch Glukose hemmt, werden die im Serum vorhandenen Substrate der Reduktion des Hämiglobins ganz ausgeschaltet. Demnach sind Glukose und Milchsäure die wesentlichen Substrate der enzymatischen Reduktion des Hämiglobins im Blute. Bei Meerschweinchen und Kaninchen wird die Reduktion des Hämiglobins im Blute hauptsächlich von der Milchsäure, beim Menschen hauptsächlich von der Glukose durchgeführt.

Die Reduktion des Hämiglobins geht mit der Bildung von Wasserstoffionen einher. Die Umwandlung von einem Äquivalent Hämiglobin zu Oxyhämoglobin setzt ein Wasserstoffion frei. Durch Reduktion mit Milchsäure wird kein weiteres Wasserstoffion freigesetzt. Bei der mit Farbstoffen beschleunigten Reduktion durch Glukose werden zwei Wasserstoffionen für ein Äquivalent Hämiglobin gebildet.

Durch die Reduktion von Hämiglobin durch Milchsäure wird eine äquivalente Menge Brenztraubensäure gebildet. Die Reduktion des Hämiglobins durch Glukose liefert in den Zellen verschiedener Tiere ebenfalls eine äquivalente Menge Brenztraubensäure. Dagegen wird bei der durch Farbstoffe beschleunigten Reduktion des Hämiglobins keine äquivalente Menge Brenztraubensäure gebildet.

Da die Reduktion des Hämiglobins durch Glukose von Brenztraubensäure nicht gehemmt wird, entsteht die Brenztraubensäure bei der Reduktion durch Glukose nicht aus Milchsäure. Als eigentliche Reduktionsreaktion wird die Reduktion des Hämiglobins durch Glyzerinaldehyd-Phosphorsäure unter Bildung von Glyzerinsäure angenommen.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Die Reduktion des Hämiglobins.

IV. Mitteilung*.

Die katalytische Wirkung einiger Farbstoffe auf die Reduktion des Hämiglobins in roten Zellen.

Von

MANFRED KIESE.

Mit 16 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. November 1944.)

Der Gehalt der roten Zellen an Hämiglobin steigt an, wenn in die Zellen ein Stoff gelangt, der das Hämoglobin schnell oxydiert oder die Oxydation des Hämoglobins durch Sauerstoff katalysiert, so daß diese Reaktion schneller verläuft als die Reduktion des Hämiglobins durch die dafür vorhandenen Fermente. Unter solchen Verhältnissen ist es von großer praktischer Bedeutung, daß man die Reduktion des Hämiglobins in den roten Zellen beschleunigen kann. Dadurch kann bei der Vergiftung mit einem hämiglobinbildenden Stoffe die Anreicherung von Hämiglobin im Blute verhindert werden. Die Beschleunigung der Reduktion des Hämiglobins gelingt durch Einführung von reversibel oxydierbaren Farbstoffen in die roten Zellen und wurde zuerst von WILLIAMS und CHALLIS[1] und STEELE und SPINK[2] mit Methylenblau am Menschen und von HAUSCHILD[3] am Kaninchen mit Methylenblau und Thionin nachgewiesen. Über den Mechanismus der katalytischen Wirkung ist bisher bekannt, daß die Farbstoffe vornehmlich die Reduktion des Hämiglobins durch Glukose, viel weniger die durch Milchsäure beschleunigen (KIESE[4]). Untersuchungen des Stoffwechsels in den roten Zellen bei der Reduktion des Hämiglobins zeigten, daß die Farbstoffe Reaktionen katalysieren, die sonst bei der Reduktion des Hämiglobins von untergeordneter Bedeutung sind (KIESE und SCHWARTZKOPFF[5]). Bei Abwesenheit von katalysierenden Farbstoffen wird während der Reduktion des Hämiglobins eine äquivalente Menge Brenztraubensäure gebildet. Die durch die Farbstoffe beschleunigte Reduktion führt jedoch nicht zur Bildung von Brenztraubensäure, sondern einer anderen Säure.

* III. Mitt. Arch. exper. Path. (D.) **204**, 267 (1946).

[1] WILLIAMS, J. R. u. F. E. CHALLIS: J. Labor. a. clin. Med. **19**, 166 (1933). — [2] STEELE, C. W. u. W. W. SPINK: New England J. Med. **208**, 1152 (1933). — [3] HAUSCHILD, F.: Arch. exper. Path. (D.) **182**, 118 (1936); **184**, 458 (1937). — [4] KIESE, M.: Biochem. Z. **316**, 264 (1944). — [5] KIESE, M. u. W. SCHWARTZKOPFF: Arch. exper. Path. (D.) (im Druck).

Die Farbstoffe werden von der Hämiglobinreduktase reduziert, und der reduzierte Farbstoff reagiert mit dem Hämiglobin. Die beiden Reaktionen verlaufen wesentlich schneller als die unmittelbare Reaktion des Hämiglobins mit der Hämiglobinreduktase, wodurch dann die Reduktion des Hämiglobins beschleunigt wird.

Ist in den roten Zellen neben dem Hämiglobin auch Sauerstoff, wie immer unter den Verhältnissen in vivo, so tritt Sauerstoff als Konkurrent für das Hämiglobin in der Reaktion mit dem reduzierten Farbstoff auf. Jedoch reagiert der reduzierte Farbstoff meist schneller mit dem Hämiglobin als mit dem molekularen Sauerstoff.

Die Oxydation des reduzierten Farbstoffes durch molekularen Sauerstoff führt eine starke Steigerung des an sich sehr geringen Sauerstoffverbrauchs der roten Zellen herbei. Diese Wirkung steht also in engstem Zusammenhang mit der Beschleunigung der Reduktion des Hämiglobins und wurde schon vor ihr von Harrop und Barron[6] entdeckt und von Barron und Mitarbeitern[7–10], Michaelis und Salomon[11] und vor allem von Warburg, Kubowitz und Christian[12] sowie Wendel[13] näher analysiert.

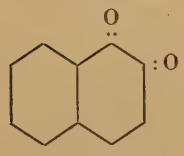
Oxydation der Hämiglobinreduktase und Reduktion des Hämiglobins bzw. Sauerstoffs sind nicht die einzigen Reaktionen, die die Farbstoffe in den roten Zellen eingehen. Vielmehr reagiert der oxydierte Farbstoff auch mit Hämoglobin unter Bildung von Hämiglobin wie Warburg, Kubowitz und Christian[14,12], Wendel[15], Warburg und Reid[17] und Michaelis und Salomon[16] gezeigt haben. Diese Reaktion verläuft langsam. Es kommt trotz dieser Reaktion in den roten Zellen nicht zur Anreicherung von Hämiglobin, weil die durch den Farbstoff beschleunigte Reduktion des Hämiglobins viel schneller verläuft. Die Reaktion spielte eine Rolle in den ersten Versuchen zur Deutung der atmungssteigernden Wirkung des Methylenblaus auf rote Zellen[11].

Neben dem Methylenblau und Thionin erwies sich noch eine Reihe anderer Farbstoffe katalytisch wirksam (Kiese[4]). Sie wurden bisher nur in ihrer Wirkung auf die Reduktion des Hämiglobins in Kohlenoxydatmosphäre geprüft, wo diese Wirkung unbeeinträchtigt von den anderen Reaktionen der Farbstoffe darzustellen ist.

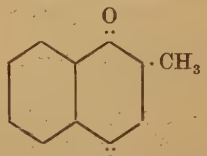
[6] Harrop, G. A. u. E. S. G. Barron: J. exper. Med. (Am.) **48**, 207 (1928). — [7] Barron, E. S. G. u. G. A. Harrop: J. biol. Chem. (Am.) **79**, 65 (1928). — [8] Barron, E. S. G.: J. biol. Chem. (Am.) **84**, 83 (1929). — [9] Barron, E. S. G. u. L. A. Hoffmann: J. gen. Physiol. (Am.) **13**, 483 (1930). — [10] Meio, R. H. de, M. Kissin u. E. S. G. Barron: J. biol. Chem. (Am.) **107**, 579 (1934). — [11] Michaelis, L. u. K. Salomon: J. gen. Physiol. (Am.) **13**, 469 (1930). — [12] Warburg, O., F. Kubowitz u. W. Christian: Biochem. Z. **227**, 245 (1930); **242**, 206 (1931). — [13] Wendel, W. B.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **28**, 401 (1931). — J. biol. Chem. (Am.) **102**, 373, 385 (1932). — [14] Warburg, O., F. Kubowitz u. W. Christian: Biochem. Z. **221**, 494 (1930). — [15] Wendel, W. B.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **27**, 624 (1930) — [16] Michaelis, L. u. K. Salomon: Biochem. Z. **234**, 107 (1931). — [17] Warburg, O. u. A. Reid: Biochem. Z. **242**, 149 (1931).

Unsere neuen Untersuchungen, die gemeinsam mit den Herren HEINZ SCHULTKA, LEO ZEITRÄGER und HEINZ ZÜRCHER durchgeführt wurden, erstrecken sich zunächst auf die anderen Reaktionen der Farbstoffe in den roten Zellen, deren Kenntnis für ihre Beurteilung wichtig ist. Dann wurde die katalytische Wirkung der Farbstoffe auf die Reduktion des Hämiglobins in Gegenwart von Sauerstoff in vitro untersucht, wobei also der Rest an katalytischer Wirkung nach Abzug der Neben- und Gegenreaktionen erfaßt wurde. Die wichtigste Aufgabe war die Untersuchung der Wirkung der Farbstoffe in vivo. Für die Bewertung der praktischen Brauchbarkeit als Heilmittel mußte die Ermittlung der Wirkungsstärke und -dauer durch Bestimmung der Toxizität ergänzt werden.

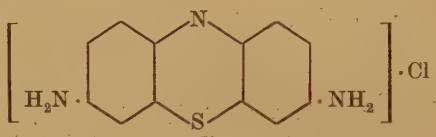
Die Untersuchungen umfaßten folgende Farbstoffe:



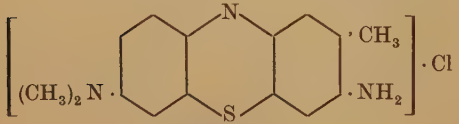
1. 1,2-Naphthochinon



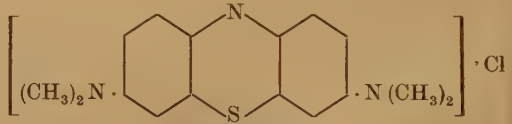
2. 2-Methyl-1,4-Naphthochinon



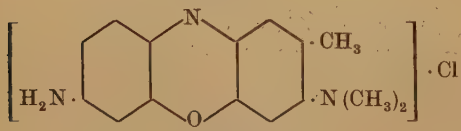
3. Thionin



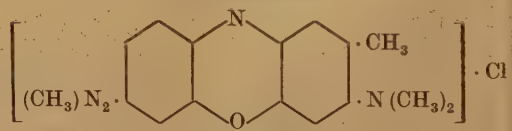
4. Toluidinblau



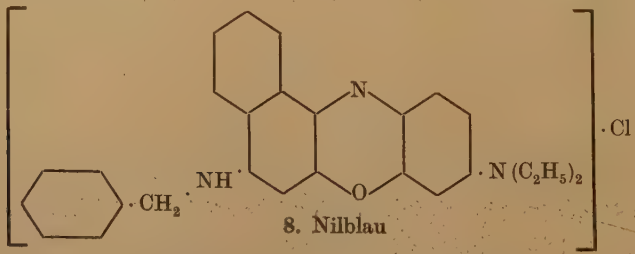
5. Methylenblau



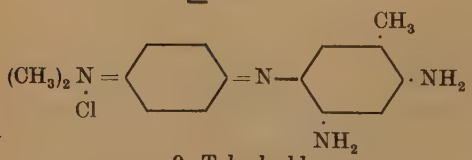
6. Kresylblau



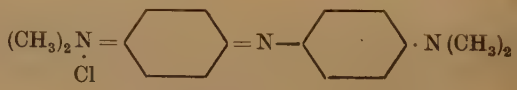
7. Capriblau



8. Nilblau



9. Toluylenblau



10. Bindschedlers Grün

Farbstoffe, die sich in früheren Untersuchungen bei der Reduktion von Hämiglobin in roten Zellen unter Kohlenoxydatmosphäre bereits als unwirksam erwiesen hatten, wurden nicht mehr geprüft.

Methodik.

Die Versuche über die Oxydation von Hämoglobin durch die Farbstoffe wurden vorwiegend mit kristallinem Pferdehämoglobin durchgeführt. Für einzelne Versuche wurde eine Hämoglobinlösung benutzt, die durch Auflösung von roten Zellen in Wasser und Behandlung der Lösung mit Aluminiumhydroxyd gewonnen wurde. In intakten roten Zellen wäre die Untersuchung dieser Reaktion nur möglich nach vollständiger Entfernung jeden zur Reduktion des Hämiglobins fähigen Substrates. Lösungen von Hämoglobin in Phosphat vom p_H 7,4 und p_H 6,8 wurden mit Farbstoff in verschiedenen Konzentrationen versetzt, in Gegenwart von Luft im Wasserbad von 37,5° langsam geschüttelt und in bestimmten Abständen der Gehalt an Hämiglobin nach Evelyn[18] und Havemann[19] bestimmt. Die aus den Ansätzen zur Analyse entnommenen Proben wurden sofort mit Wasser verdünnt, das mit Kohlenoxyd gesättigt war. Durch die Bindung des Hämoglobins an das Kohlenoxyd und durch die Verdünnung wurde die weitere Reaktion des Farbstoffs mit dem Hämoglobin stark gehemmt. Dies Verfahren wurde auch bei den Versuchen über die Wirkung der Farbstoffe auf die Reduktion des Hämiglobins in den roten Zellen in vitro angewandt.

Der Einfluß der Farbstoffe auf die Reduktion des Hämiglobins in Gegenwart von Sauerstoff wurde an roten Zellen vom Menschen untersucht, weil in diesen die katalytische Wirkung im Vergleich zur nicht katalysierten Reduktion am stärksten ist. Die Zellen wurden nach Entfernung des Serums zur Oxydation des Hämoglobins mit Nitrit behandelt. Zur Entfernung des überschüssigen Nitrits wurden sie dreimal mit Phosphat-Ringer-Lösung gewaschen. Für die Messung der Geschwindigkeit der Reduktion des Hämiglobins wurden die Zellen in Phosphat-Ringer-Lösung suspendiert, so daß die Konzentration der Suspension an Gesamthämoglobin etwa 6% betrug. Danach wurde Glukose in einer Konzentration von 0,18 g/100 ccm bzw. Glukose und Farbstoff zugesetzt und der Ansatz bei 37,5° gehalten. In Abständen von 15—60 Min. wurden Proben zur Bestimmung des Hämiglobingehaltes entnommen.

Die Atmung der roten Zellen wurde manometrisch im Warburg-Apparat bestimmt. Die Zellen wurden ebenfalls in Phosphat-Ringer-Lösung suspendiert. Flüssigkeitsmenge im Hauptraum und Birne 3,6 ccm. In den Einsatz wurden 0,4 ccm zwei molare Natronlauge und ein Stückchen Filterpapier, das den Rand überragte, gegeben. Im Gasraum war Luft, die Temperatur betrug 37,5°.

[18] Evelyn, K. A. u. H. T. Malloy: J. biol. Chem. (Am.) **126**, 655 (1938). — [19] Havemann, R., F. Jung, B. v. Issekutz jun.: Biochem. Z. **301**, 116 (1939).

Die Beschleunigung der Reduktion des Hämiglobins durch die Farbstoffe in vivo wurde an Hunden untersucht. Es wurden zwei verschiedene Bedingungen gewählt. Durch die intravenöse Injektion von 25 mg/kg Natriumnitrit wurde im Blut Hämiglobin bis zu Konzentrationen von 4—6 g/100 ccm erzeugt. Da das Nitrit schnell aus dem Blute verschwand, begann die Hämiglobinkonzentration nach etwa einer Stunde bereits wieder zu sinken. Der zu prüfende Farbstoff wurde 30 Min. nach der Injektion des Nitrits intravenös injiziert und die Abnahme des Hämiglobins durch Blutentnahmen und Hämiglobinbestimmungen in Abständen von 10, später mehr Minuten verfolgt. Um die Dauer der Wirkung und ihre Reproduzierbarkeit bei Wiederholung der Injektion zu untersuchen, wurde durch subkutane Injektion von m-Dinitrobenzol in öliger Lösung eine Erhöhung des Hämiglobingehaltes über viele Stunden herbeigeführt und während des Anstiegs der Hämiglobinkonzentration der Farbstoff injiziert.

Tabelle 1. *Löslichkeit von Farbstoffen in Wasser bei 21°.*

Farbstoff	Farbstoff in 100 ccm Lösung g
Kresylblau	5,8
Toluidinblau	4,8
Thionin	4,3
Methylenblau . . .	1,8

Die Toxizität der Farbstoffe wurde an Ratten bestimmt. Die Farbstoffe wurden in 0,9%iger Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert. Die nicht genügend in Wasser löslichen Farbstoffe wurden in Öl suspendiert und so intraperitoneal injiziert. Einige vergleichende Bestimmungen zeigten, daß die Wirkung der Farbstoffe bei beiden Formen der Darreichung etwa gleich war. Bei der Verwendung öliger Suspensionen war die Streuung größer. Nach einigen orientierenden Versuchen wurden zwei Gruppen von je 20 Tieren Dosen verabreicht, die in der Nähe der zu erwartenden mittleren tödlichen Dosis lagen. Das Ergebnis wurde nach 24 Stunden abgelesen. Die mittlere tödliche Dosis und Streuung wurden dann im Wahrscheinlichkeitsnetz ermittelt.

Für die Farbstoffe, die in vivo stark katalytisch wirksam und von geringer Toxizität waren, wurde die Löslichkeit in Wasser bestimmt, indem Farbstoff im Überschuß 8—10 Stunden mit Wasser bei 37° geschüttelt wurde. Nachdem die Lösung dann 24 Stunden bei 21° gestanden hatte, wurde abzentrifugiert und der Gehalt an Trockensubstanz in der Lösung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Versuchsergebnisse.

I. Die Oxydation des Hämoglobins durch Farbstoffe.

WARBURG[14, 12, 17], WENDEL[15] und MICHAELIS[16] haben zuerst gezeigt, daß Methylenblau Hämoglobin zu oxydieren vermag und daß sich bei Abwesenheit von Sauerstoff ein Gleichgewicht zwischen Hämoglobin,

Hämiglobin, Methylenblau und Leukomethylenblau einstellt. Für unsere Untersuchungen interessierte besonders die Geschwindigkeit der Oxydation des Hämoglobins durch einen Farbstoff in Gegenwart von Sauerstoff. Wir haben darum einerseits die Beziehungen zwischen Oxydationsgeschwindigkeit und Farbstoffkonzentration und andererseits die von verschiedenen Farbstoffen erreichte Oxydationsgeschwindigkeit bei gleicher Farbstoffkonzentration untersucht.

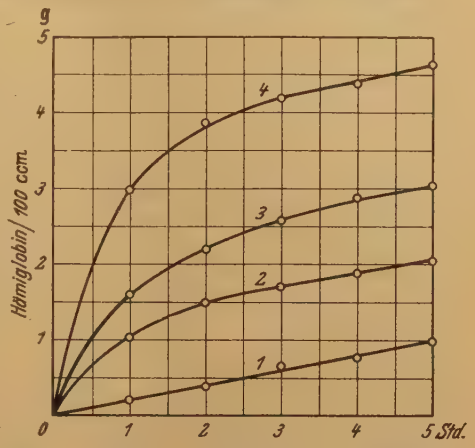


Abb. 1. Oxydation von Hämoglobin durch Methylenblau in Gegenwart von Sauerstoff. Pferdehämoglobin 7,1% in 0,03 Mol Phosphat p_H 7,4. Temp. 37,5°, Gasraum Luft. *1* kein Farbstoff, *2* $1 \cdot 10^{-5}$ Mol/l Methylenblau, *3* $4 \cdot 10^{-5}$ Mol/l Methylenblau, *4* $20 \cdot 10^{-5}$ Mol/l Methylenblau.

Nach Zusatz des Farbstoffs zur Hämoglobinlösung verlief die Oxydation des Hämoglobins zunächst schnell und nahm bald ab, um sich schließlich der Geschwindigkeit der Hämiglobinbildung ohne Farbstoff durch unmittelbare Reaktion von Hämoglobin und Sauerstoff zu nähern. Die anfängliche Geschwindigkeit der Hämiglobinbildung und die Hämiglobinkonzentration, bei der die Wirkung des Farbstoffs aufhörte, waren von der Farbstoffkonzentration abhängig. In Abb. 1 ist eine Gruppe von Messungen der Oxydationsgeschwindigkeit bei gleicher Hämoglobinkonzentration und verschiedener Farbstoffkonzentration wiedergegeben. Die Hämoglobinkonzentration zu Beginn des Versuchs betrug 7,1 g/100 ccm. Bei allen Farbstoffkonzentrationen mündete die Oxydationsgeschwindigkeit weit vor dem Umsatz des gesamten Hämoglobins in die Geschwindigkeit der unkatalysierten Oxydation des Hämoglobins durch Sauerstoff ein. Aus Abb. 1 ist bereits ersichtlich, daß die Anfangsgeschwindigkeit der Oxydation des Hämoglobins von der Farbstoffkonzentration abhängig war. Wie Abb. 2 beweist, war die Oxydationsgeschwindigkeit jedoch nicht der Farbstoffkonzentration proportional, vielmehr näherte sich die Oxydationsgeschwindigkeit mit steigender Farbstoffkonzentration einem Grenzwert. Der hier für das Methylenblau beschriebene Ablauf der Reaktion

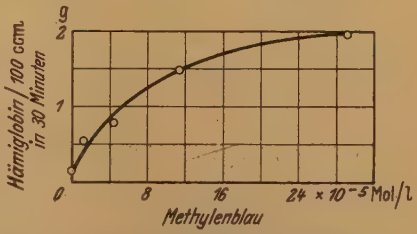


Abb. 2. Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Oxydation von Hämoglobin durch Methylenblau von der Methylenblaukonzentration. Hämoglobin 9,3% in 0,018 mol Phosphat p_H 6,8. Temp. 37,5°, Gasraum Luft. Ordinate: Geschwindigkeit der Hämiglobinbildung als Änderung der Hämiglobinkonzentration in 30 Min.

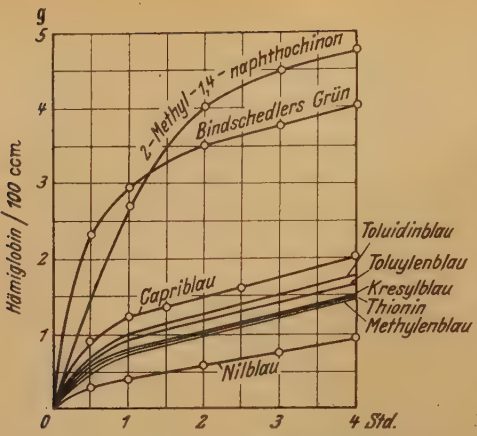


Abb. 3. Oxydation von Hämoglobin durch verschiedene Farbstoffe in Gegenwart von Sauerstoff. Gesamthämoglobin (Kaninchen) 7,0% = 4,1 · 10^{-3}. Äquivalent/l. Farbstoff 10^{-4} Mol/l. Phosphat 0,02 Mol/l · p_H 6,8. Temp. 37,5°, Gasraum Luft. Ordinate: Hämiglobinkonzentration.

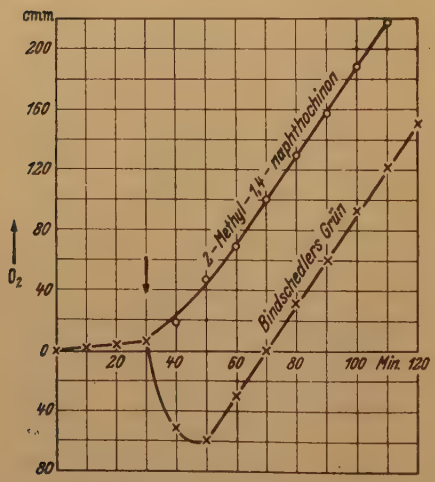


Abb. 4. Änderung der Sauerstoffaufnahme roter Zellen vom Kaninchen nach Zusatz von 2-Methyl-1,4-naphthochinon und Bindschedlers Grün. Die Abgabe von Sauerstoff nach Zusatz von Bindschedlers Grün ist durch Umwandlung von Oxyhämoglobin in Hämiglobin bedingt, 1 ccm rote Zellen mit 32,0% Gesamthämoglobin in Phosphat RINGER-Lösung. Flüssigkeitsmenge 3,6 ccm. Glukose 0,25%. Farbstoffkonzentration 10^{-4} Mol/l. Temp. 37,5°. Gasraum Luft.

zwischen Farbstoff und Hämoglobin und die Beziehungen zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Farbstoffkonzentration wurden grundsätzlich bei anderen Farbstoffen auch so gefunden, doch waren quantitative Unterschiede vorhanden, sowohl in der Anfangsgeschwindigkeit der Oxydation wie der durch die Umsetzung mit dem Farbstoff erreichten Hämiglobinkonzentration. Zum Vergleich der Geschwindigkeit der Oxydation des Hämoglobins durch verschiedene Farbstoffe wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Oxydation bei äquimolarer Farbstoffkonzentration bestimmt. Abb. 3 enthält eine Reihe entsprechender Messungen. Toluidinblau, Kresylblau, Thionin und Methylenblau waren in ihrer Wirkung nur wenig verschieden. Capriblau oxydierte schneller als diese und Nilblau langsamer. Den Thiazin- und Oxazinfarbstoffen ähnlich reagierte das Toluylenblau. Bindschedlers Grün und 2-Methyl-1,4-naphthochinon oxydierten Hämoglobin weit schneller als die anderen Farbstoffe und oxydierten auch einen erheblich größeren Anteil des Hämoglobins. Während jene in der Lösung von 7,0% Hämoglobin nur 0,5—1% Hämiglobin bildeten, oxydierten diese mehr als die Hälfte des Hämoglobins zu Hämiglobin. Der Unterschied der Reaktion des Toluylenblaus und des Bindschedlerschen Grün, die chemisch nahe verwandt sind, ist besonders auffällig und von Interesse für die später zu beschreibenden Wirkungen.

Wurden die Farbstoffe intakten roten Zellen, die Glukose zur Verfügung hatten, zugesetzt, so nahm die Hämiglobinkonzentration nur zu, wenn Bindschedlers Grün zugesetzt wurde (Abb. 4). Bei den anderen Farbstoffen war die Beschleunigung der Reduktion des Hämiglobins größer als die Hämiglobinbildung. Das gleiche galt auch für die Wirkung der Farbstoffe im Tier. Nach Injektion der Farbstoffe, die die Reduktion des Hämiglobins in vitro in Gegenwart von Sauerstoff stark beschleunigten, wurde nie eine Erhöhung der Hämiglobinkonzentration beobachtet, wohl aber nach der Injektion von Bindschedlers Grün (Tabelle 2).

Tabelle 2. *Hämiglobinbildung in vivo durch Bindschedlers Grün.*
Hund 10,0 kg, 10 mg/kg Bindschedlers Grün in 10 ccm 0,9% NaCl-Lösung intravenös.

Zeit Min.	Hämoglobin in 100 ccm Blut g	Gesamthämoglobin in 100 ccm Blut g
0	0,2	15,0
Intravenöse Injektion von 10 mg/kg Bindschedlers Grün		
10	3,8	15,5
20	3,6	15,2
30	3,1	15,1

II. Die Steigerung der Atmung der roten Zellen durch Farbstoffe.

Diese Wirkung ist bereits wiederholt untersucht worden, wie einleitend erwähnt ist. Es sollen hier nur einige besondere Fragen geklärt werden, die für das Verständnis der katalytischen Wirkung der Farbstoffe auf die Reduktion des Hämiglobins wichtig sind.

Während die durch verschiedene Farbstoffe maximal erreichbare Beschleunigung der Reduktion des Hämiglobins auch in Abwesenheit von Sauerstoff sehr verschieden ist, waren in der Wirkung der Farbstoffe auf die Atmung der roten Zellen nur geringe Unterschiede vorhanden. Lediglich das Toluylenblau war ein wenig schwächer als die anderen (Tabelle 3). Die Wirkung des Nilblaus nahm bei Anwendung hoher Konzentrationen wie in den Versuchen der Tabelle 3 mit der Zeit ab.

Tabelle 3. *Steigerung der Atmung der roten Zellen des Kaninchens durch verschiedene Farbstoffe.*
1 ccm rote Zellen mit 32% Gesamthämoglobin in Phosphat-Ringer-Lösung, Glukose 0,4%, Farbstoff 10^{-4} Mol/l, Gesamtflüssigkeit 3,6 ccm, Gasraum Luft, Temp. 37,5°.

Farbstoff	Sauerstoffverbrauch ccm O_2/Min.
2-Methyl-1,4-naphthochinon	3,5
Methylenblau	3,6
Toluidinblau	3,5
Thionin	3,4
Capriblau	3,0
Kresylblau	2,8
Nilblau	2,8
Bindschedlers Grün	2,8
Toluylenblau	2,0
Ohne Farbstoff	0,2

Besonders erwähnenswert ist die Wirkung des 2-Methyl-1,4-naphthochinons und des Bindschedlerschen Grüns. Bei der manometrischen

Messung der Sauerstoffaufnahme wurde auf Zusatz von Bindschedlers Grün zu den roten Zellen zunächst eine Abgabe von Sauerstoff beobachtet. Diese hörte nach etwa 20 Min. auf und wurde dann von einer Sauerstoffaufnahme abgelöst, die in ihrer Geschwindigkeit der nach Zusatz anderer Farbstoffe beobachteten entsprach. Durch die schnelle Oxydation von Oxyhämoglobin zu Hämiglobin setzte das Bindschedlersche Grün zunächst mehr Sauerstoff frei, als die Atmungssteigerung ausmachte. Erst nachdem die Hämiglobinbildung zum Stillstand gekommen war, trat ausschließlich die Atmungssteigerung in Erscheinung (Abb. 4). Der anfänglichen Hämiglobinbildung und der dadurch bedingten Abgabe von Sauerstoff ist es wohl zuzuschreiben, daß HARROP und BARRON[6] die stoffwechselsteigernde Wirkung des Bindschedlerschen Grüns viel niedriger fanden als die der anderen Farbstoffe.

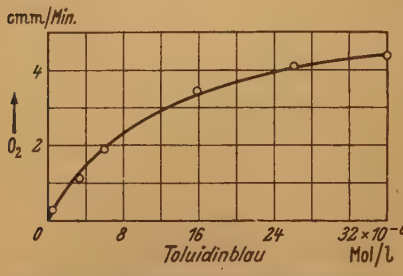


Abb. 5. Abhängigkeit der Steigerung der Sauerstoffaufnahme der roten Zellen von der Konzentration des Farbstoffs (Toluidinblau). 1 ccm rote Zellen vom Kaninchen mit 34,9% Gesamthämoglobin in Phosphat-RINGER-Lösung. Glukosekonzentration 0,25%. Temp. 37,5°. Gasraum Luft. Ordinate: Zunahme des Sauerstoffverbrauchs in cmm/Min.

Das 2-Methyl-1,4-naphthochinon bildete zunächst ebenfalls Hämiglobin. In Übereinstimmung mit den in Abb. 3 wiedergegebenen Ergebnissen war die Geschwindigkeit der Oxydation des Hämoglobins langsamer. Es wurde nach der Zugabe des Naphthochinons nicht eine Abgabe von Sauerstoff beobachtet, sondern nur eine geringere Sauerstoffaufnahme als der Atmungssteigerung entsprach. Diese trat dann 30—40 Min. nach Zusatz des Naphthochinons voll in Erscheinung (Abb. 4). Die anderen Farbstoffe erhöhten die Hämiglobinkonzentration in den roten Zellen nicht.

Bei Konzentrationen der Farbstoffe über $3 \cdot 10^{-5}$ Mol/l war die Steigerung des Stoffwechsels praktisch unabhängig von der Farbstoffkonzentration. Unterhalb dieser Konzentration nahm die Wirkung mit der Konzentration ab, zunächst wenig und dann immer mehr, bis schließlich unterhalb einer Farbstoffkonzentration von $5 \cdot 10^{-7}$ Mol/l die atmungssteigernde Wirkung nicht mehr nachweisbar war. Diese Daten beziehen sich auf die in Abb. 5 wiedergegebenen Messungen mit Toluidinblau. Für die anderen Farbstoffe ergaben sich ähnliche Beziehungen zwischen Konzentration und Wirkung. Bei der Oxydation von Hexosemonophosphat (ROBISON-Ester) durch hämolysierte rote Zellen hatten WARBURG und CHRISTIAN[20] ähnliche Beziehungen zwischen der Farbstoffkonzentration und Steigerung des Sauerstoffverbrauchs gefunden.

[20] WARBURG, O. u. W. CHRISTIAN: Biochem. Z. 242, 206 (1931).

III. Die katalytische Wirkung der Farbstoffe in vitro bei Gegenwart von Sauerstoff.

Die meisten Farbstoffe, die bei Ausschluß von Sauerstoff die Reduktion des Hämiglobins durch Glukose beschleunigten, hatten diese Wirkung auch in Gegenwart von Sauerstoff. In der Wirkungsstärke ergaben sich jedoch Unterschiede.

Diese waren bei den einzelnen Farbstoffen verschieden. Auch bei den Farbstoffen, die die stärkste katalytische Wirkung in Gegenwart von Sauerstoff hatten, war diese geringer als bei Reduktion in Kohlenoxydatmosphäre. Das Verhältnis der Wirkung in Gegenwart und Abwesenheit von Sauerstoff ist an einem Versuch veranschaulicht, in dem rote Zellen vom Menschen teils ohne Farbstoffzusatz, teils mit Farbstoff unter Sauerstoff sowie teils mit Farbstoff unter Kohlenoxyd Hämiglobin reduzierten (Tabelle 4).

Tabelle 4. *Katalytische Wirkung von Toluidinblau auf die Reduktion des Hämiglobins in roten Zellen vom Menschen unter Sauerstoff und unter Kohlenoxyd.* Rote Zellen in Phosphat-RINGER-Lösung, Glukosekonzentration 0,15%, Farbstoffkonzentration $3{,}4 \cdot 10^{-6}$ Mol/l, Temp. 37°. Reduktionsgeschwindigkeit R gemessen in γ Hämiglobin je Million rote Zellen je Stunde. Für die Farbstoffe ist angegeben ΔR, die Zunahme der Reduktionsgeschwindigkeit durch den Farbstoff gegenüber der Reduktionsgeschwindigkeit ohne Farbstoff.

Glukose	Toluidinblau + Glukose	
	Sauerstoff (Luft)	Kohlenoxyd
R	ΔR	ΔR
3,7	15,2	23,9

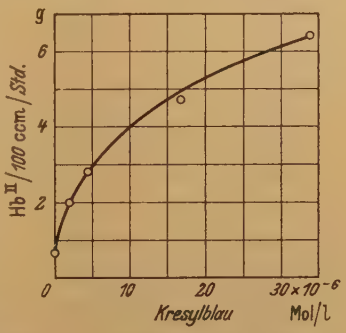


Abb. 6. Abhängigkeit der katalytischen Wirkung des Kresylblaus auf die Reduktion des Hämiglobins in roten Zellen des Menschen von der Farbstoffkonzentration. Rote Zellen mit 6,2% Hämiglobin und 6,5% Gesamthämoglobin in Phosphat-RINGER-Lösung. Glukosekonzentration 0,15% Temp. 37°. Gasraum Luft. Ordinate: Reduktionsgeschwindigkeit gemessen als Zunahme der Hämoglobinkonzentration je Stunde. Bei der Farbstoffkonzentration 0 ist die Reduktionsgeschwindigkeit ohne Zusatz von Farbstoff eingetragen.

Die Beziehungen zwischen Wirkung und Farbstoffkonzentration waren bei Abwesenheit und Gegenwart von Sauerstoff sehr ähnlich. Die katalytische Wirkung war der Farbstoffkonzentration nicht proportional, vielmehr näherte sich die Farbstoffwirkung mit steigender Konzentration einem Grenzwert (Abb. 6). Diese Beziehungen waren bei allen hier untersuchten Farbstoffen grundsätzlich ähnlich.

Die stärkste katalytische Wirkung hatten die Oxazin- und Thiazinfarbstoffe Toluidinblau, Thionin, Nilblau, Kresylblau, Capriblau und Methylenblau. Ihre Wirkung war so ähnlich, daß nur durch eine sehr große Zahl von Messungen geringe Unterschiede nachgewiesen werden könnten. In der Tabelle 5 sind mehrere Versuche zusammengestellt, bei denen jeweils

Tabelle 5. *Katalytische Wirkung von Thiazin- und Oxazinfarbstoffen auf die Reduktion des Hämiglobins in roten Zellen vom Menschen in Gegenwart von Sauerstoff.* Rote Zellen in Phosphat-RINGER-Lösung, Glukosekonzentration 0,15%, Farbstoffkonzentration $3{,}4 \cdot 10^{-6}$ Mol/l, Temp. 37°, Gasraum Luft. Reduktionsgeschwindigkeit R gemessen in γ Hämiglobin je Million rote Zellen je Stunde. Bei den Farbstoffen geben die Zahlen die Zunahme der Geschwindigkeit gegenüber der Reduktion durch Glukose allein, also ΔR, an.

Nr.	Glukose R	Toluidinblau ΔR	Thionin ΔR	Nilblau ΔR	Kresylblau ΔR	Capriblau ΔR	Methylenblau ΔR
1	2,3	—	18,3	19,0	14,1	—	12,0
2	3,6	—	13,4	10,0	11,4	14,0	9,8
3	3,7	16,6	11,0	—	—	11,3	14,5
4	4,0	10,8	11,0	11,2	10,0	9,1	8,3
Mittel	3,4	13,7	13,4	13,4	11,8	11,5	11,1

verschiedene Farbstoffe in der Konzentration von $3{,}4 \cdot 10^{-6}$ Mol/l gleichzeitig an den roten Zellen einer Blutprobe geprüft wurden. Die Farbstoffkonzentration wurde niedrig gewählt, da bei der großen Reduktionsgeschwindigkeit, die durch höhere Farbstoffkonzentrationen erreicht werden kann, die Messung der Geschwindigkeit ungenauer ist.

Da die Zellkonzentrationen in den verschiedenen Versuchen nicht ganz gleich waren, wurde die Geschwindigkeit der Reduktion des Hämiglobins wie früher[21] in einem vergleichbaren Maße angegeben, nämlich als γ Hämiglobin, die von 1 Million roter Zellen in einer Stunde reduziert wurden. Dabei wurde eine Konzentration von 15% Gesamthämoglobin einer Zellkonzentration von 5 Millionen je Kubikmillimeter gleichgesetzt. Toluylenblau steigerte in gleicher Konzentration die Reduktionsgeschwindigkeit im Mittel um 4 und 2-Methyl-1,4-naphthochinon um 2 γ Hämiglobin je Million rote Zellen je Stunde. Bindschedlers Grün war wirkungslos.

Diejenigen Farbstoffe, die überhaupt wirksam waren, ermöglichten eine schnelle Reduktion bis zu Hämiglobinkonzentrationen, die mit der angewandten Methode nicht mehr nachweisbar waren. Es blieb kein Rest von Hämiglobin bestehen.

IV. Die katalytische Wirkung der Farbstoffe auf die Reduktion des Hämiglobins in vivo.

A. Hämiglobinbildung durch Nitrit.

Nach intravenöser Injektion von 25 mg/kg Natriumnitrit als 4%ige wäßrige Lösung stieg bei Hunden die Hämiglobinkonzentration in 30 Min. schnell auf 4—7 g/100 ccm an* und begann nach einer Stunde etwa

[21] KIESE, M. u. B. WEIS: Arch. exper. Path. (D.) **202**, 493 (1943).

* In einer früheren Arbeit (GAEDE, D. u. M. KIESE: Klin. Wschr. **1944 I**, 92.) ist zur Bildung von Hämiglobin bei Hunden versehentlich eine Dosis von 2,5 mg/kg Natriumnitrit genannt worden. Auch dort war eine Dosis von 25 mg/kg angewandt worden.

gradlinig abzufallen. Dieser Ablauf der Änderung der Hämiglobinkonzentration ist in Abb. 7 wiedergegeben, weil er für die Beurteilung der Wirkung der Farbstoffe erforderlich ist. Unsere Versuchsergebnisse stimmen weitgehend mit denen von Cox und Wendel[22] überein. Die Umsetzung des Nitrits mit Hämoglobin verläuft nicht in wenigen Sekunden zu Ende, sondern erst im Laufe von vielen Minuten, wie bei der Herstellung von Hämiglobin mit Nitrit in vitro leicht zu beobachten ist und von Greenberg, Lester und Haggard[23] gemessen wurde. Darum erreicht auch in vivo die Hämiglobinkonzentration erst etwa 45 Min. nach der intravenösen Injektion von Nitrit den Höhepunkt. Der anschließende Abfall der Hämiglobinkonzentration entspricht nicht ganz der Geschwindigkeit der Reduktion des Hämiglobins, sondern verläuft langsamer. Das ist zunächst schon wahrscheinlich, weil auch noch eine Stunde und länger nach der Injektion geringe Nitritkonzentrationen im Blute sind und immer noch Hämiglobin bilden, wie Greenberg, Lester und Haggard[23] gezeigt haben. Außerdem ergab sich aus Untersuchungen, bei denen Hunden hämiglobinhaltige rote Zellen injiziert und die Abnahme des Hämiglobins gemessen wurde, eine höhere Reduktionsgeschwindigkeit. Da diese Untersuchungen bereits früher (Kiese und Weis[21]) verwertet, aber noch nicht veröffentlicht wurden, sei hier ein Versuch mitgeteilt, der diese Angaben belegt (Abb. 8). Die dem Tiere infundierten Zellen enthielten praktisch nur Hämiglobin. Nach der Injektion betrug der Hämiglobingehalt des Blutes 6,2% und der Gehalt an Gesamthämoglobin 15%. Demnach waren etwa 2 Millionen hämiglobinhaltige Zellen im Kubikmillimeter Blut. In diesen nahm die Hämiglobinkonzentration in einer Stunde um 1,3% ab. Wenn alle Zellen im Blute bei einer Konzentration von etwa 5 Millionen im Kubikmillimeter an der Reduktion des Hämiglobins beteiligt sind, ergibt sich eine Reduktionsgeschwindigkeit von 3,2% Hämiglobin in der Stunde. Demgegenüber betrug die Geschwindigkeit der Reduktion des Hämiglobins nach der Injektion von Nitrit nur 1,8% Hämiglobin in der Stunde.

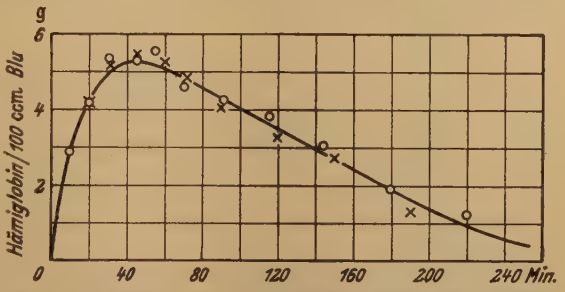


Abb. 7. Abnahme der Hämiglobinkonzentration nach Hämiglobinbildung in vivo durch Injektion von 25 mg/kg Natriumnitrit. Hund 73; 26 kg. × × erster Versuch; o o zweiter Versuch 2 Tage später.

[22] Cox, W. W. u. W. B. Wendel: J. biol. Chem. (Am.) **143**, 331 (1942). — [23] Greenberg, L. A., D. Lester, H. W. Haggard: J. biol. Chem. (Am.) **151**, 665 (1943).

Die zu prüfenden Farbstoffe wurden 30 Min. nach der Injektion des Nitrits in wäßriger Lösung mit einem Zusatz von 0,9 g NaCl auf 100 ccm intravenös injiziert. Ohne Injektion eines Farbstoffs änderte sich die

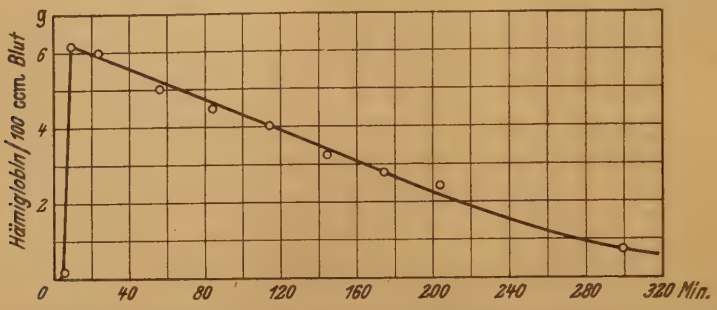


Abb. 8. Reduktion des Hämiglobins in vivo nach der Infusion hämiglobinhaltiger Zellen. Hund 27 kg. Chloralosenarkose, Entnahme von 450 ccm Blut aus einer A. carotis. Danach Infusion von 350 ccm roten Zellen mit 29,5% Gesamthämoglobin und 29,3% Hämiglobin in eine V. jugularis. Der Gehalt des Hundeblutes an Gesamthämoglobin betrug vor der Infusion 12% und bewegte sich nach der Infusion während des ganzen Versuches zwischen 15 und 16%.

Hämiglobinkonzentration in den folgenden 20 Min. nur wenig, meist nahm sie noch etwas zu. Durch Injektion von 10 mg/kg eines der stärkst wirksamen Farbstoffe wie Kresylblau oder Toluidinblau wurde die Hämiglobinkonzentration innerhalb 10 Min. fast auf normale Werte gesenkt (Abb. 9). Das entspricht einer Reduktionsgeschwindigkeit von 30,6 g Hämiglobin in 100 ccm Blut je Stunde und bedeutet eine Zunahme auf das 10fache der normalen Reduktionsgeschwindigkeit oder gar das 17fache der Abnahme des Hämiglobins nach der Injektion von Nitrit. Die Wirkung war abhängig von der Dosis. Durch Dosen von 2 mg/kg konnten noch einwandfrei nachweisbare Wirkungen erzielt werden. Dosen über 10 mg/kg haben wir in diesen Untersuchungen nicht angewandt. Die Reduktion verlief dann so schnell, daß die Wirkung verschiedener Farbstoffe nicht unterschieden werden konnte. Ferner war die durch die Injektion von Nitrit erreichte Konzentration des Hämiglobins von Einfluß auf die beobachtete Wirkung der Farbstoffe, da die Reduktion des Hämiglobins unterhalb einer Konzentration von 1—2% langsamer verläuft als bei höheren[4].

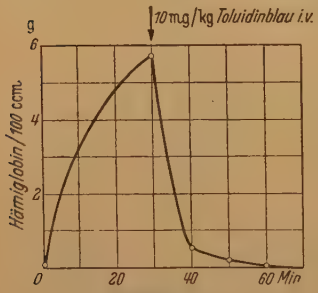


Abb. 9. Beschleunigung der Reduktion des Hämiglobins in vivo durch Toluidinblau nach Hämiglobinbildung durch Nitrit. Hund 73, 27,7 kg. 25 mg/kg Natriumnitrit intravenös, nach 30 Min. 10 mg/kg Toluidinblau intravenös. Gesamthämoglobin 12%.

Als Maß für den Vergleich der Wirkung der einzelnen Farbstoffe haben wir die Abnahme der Hämiglobinkonzentration in den ersten 10 Min. nach der Injektion des Farbstoffs gewählt. In der Tabelle 6 sind die Ergebnisse

Tabelle 6. *Katalytische Wirkung von Farbstoffen auf die Reduktion des Hämiglobins in Hunden nach Hämiglobinbildung durch intravenöse Injektion von 25 mg/kg Natriumnitrit.* Intravenöse Injektion der Farbstoffe 30 Min. nach der Injektion von Nitrit.

Hund	Farbstoff	Dosis mg/kg	Hb^{III} vor der Farbstoffinjektion g/100 ccm	Abnahme der Hb^{III}-Konzentration in 10 Min. g/100 ccm
Z 3	Toluidinblau	5	3,9	1,9
Z 3	,,	5	6,1	3,0
Z 3	,,	10	3,7	2,9
Z 4	,,	10	4,9	4,1
	,,	10	5,7	5,1
	,,	10	5,1	4,2
	Kresylblau	2	3,6	0,5
Z 3	,,	5	5,9	1,9
Z 3	,,	5	5,8	1,9
Z 3	,,	10	6,4	3,0
Z 4	,,	10	5,3	2,8
	,,	10	6,7	4,3
	,,	10	5,8	3,4
	Methylenblau	5	3,2	1,5
	,,	5	6.3	2,2
	,,	5	5,0	2,0
	,,	5	5,4	2,7
Z 3	,,	5	3,7	1,4
Z 3	,,	5	5,8	0,7
Z 3	,,	5	4,1	0,8
Z 3	,,	10	4,6	2,4
	,,	10	5,3	2,3
	,,	10	3,8	2,6
	Thionin	5	5,3	1,8
	,,	5	3,1	1,7
Z 3	,,	10	4,9	2,8
	,,	10	5,6	3,0
	,,	10	5,2	2,9
Z 3	Capriblau	5	6,5	2,1
	,,	5	3,6	0,9
Z 3	,,	10	5,7	2,7
	,,	10	5,3	3,1
	Nilblau	5	4,7	0,6
	2-Methyl-1,4-naphthochinon	2,5	4,8	0,4
	Toluylenblau	5	4,5	0,5
	,,	5	5,7	1,0
	,,	10	5,2	1,6
	,,	10	5,4	1,4
	Bindschedlers Grün	5	7,5	— 1,0
	,,	5	3,7	— 0,5
	,,	10	4,5	— 0,9

einer Reihe von Versuchen zusammengestellt. Sehr viele Versuche wurden am gleichen Hunde durchgeführt, um individuelle Schwankungen beim Vergleich der Farbstoffe auszuschließen. Es ist ersichtlich, daß auch unter sonst ähnlichen Bedingungen, wie gleiches Versuchstier und gleiche Hämiglobinkonzentration zur Zeit der Farbstoffinjektion, die Farbstoffwirkung schwankt. Die Wirksamkeit der Oxazin- und Thiazinfarbstoffe Toluidinblau, Kresylblau, Capriblau, Thionin und Methylenblau war nur wenig verschieden. Wenn man zum Vergleich lediglich Versuche heranzieht, bei denen die Hämiglobinkonzentration zur Zeit der Farbstoffinjektion über 4% betrug, erscheint Toluidinblau im Durchschnitt ein wenig wirksamer als Kresylblau, Capriblau, Methylenblau und Thionin. Die anderen Farbstoffe standen in ihrer Wirkung hinter diesen weit zurück. Nilblau und die Naphthochinone konnten nur in kleinen Dosen angewandt werden, da Dosen von 5 mg/kg bereits toxisch waren. Aber auch diese kleinen Dosen waren weniger wirksam als entsprechende Dosen der oben genannten Farbstoffe. Toluylenblau war den Oxazinen und Thiazinen ebenfalls unterlegen, und Bindschedlers Grün ganz wirkungslos.

B. Hämiglobinbildung durch m-Dinitrobenzol.

Durch die intravenöse Injektion von Nitrit wird der Hämiglobingehalt des Blutes nur kurze Zeit erhöht. Die Injektion eines katalytisch wirksamen Farbstoffs 30 Min. nach der des Nitrits senkte den Hämiglobingehalt schnell auf normale Werte. Infolge der kurzen Dauer der Nitritwirkung war die Dauer der Wirkung eines Farbstoffs nicht zu beurteilen. Der Vorzug der Verwendung von Nitrit zur Bildung von Hämiglobin lag darin, daß außer einer geringen Anämie dem Tier keine nennenswerten Schäden zugefügt wurden und somit am gleichen Tier eine große Zahl von Versuchen durchgeführt werden konnte.

Für die Beurteilung der Wirkungsdauer der Farbstoffe und ihrer Wirkung bei Wiederholung der Injektion war eine langanhaltende Hämiglobinbildung erforderlich. Wir verwandten dazu m-Dinitrobenzol, dessen langdauernde Wirkung von ISSEKUTZ[24] bereits beschrieb. Das m-Dinitrobenzol wurde in einer Menge von 10 mg/kg in Öl gelöst Hunden subcutan injiziert. Der unbeeinflußte Ablauf der Bildung und Reduktion des Hämiglobins bei Hunden nach 10 mg/kg m-Dinitrobenzol ist in Abb. 10 wiedergegeben. Die Hämiglobinkonzentration stieg allmählich an, erreichte nach 8—12 Stunden ihren Höchstwert und fiel dann sehr langsam wieder ab, so daß erst nach 30—40 Stunden die normale Hämiglobinkonzentration erreicht wurde. Der Ablauf auch dieser Vergiftung variierte natürlich individuell. In einer Gruppe von 10 Tieren beobachteten wir als Höchstwert der Hämiglobinkonzentration im Mittel $6{,}6 \pm 0{,}9$ g/100ccm. Der

[24] ISSEKUTZ, B. v. jun.: Arch. exper. Path. (D.) **193**, 551 (1939).

Höchstwert wurde im Mittel nach 12 Stunden erreicht. Die Vergiftung mit m-Dinitrobenzol konnte erst nach Wochen wiederholt werden, da

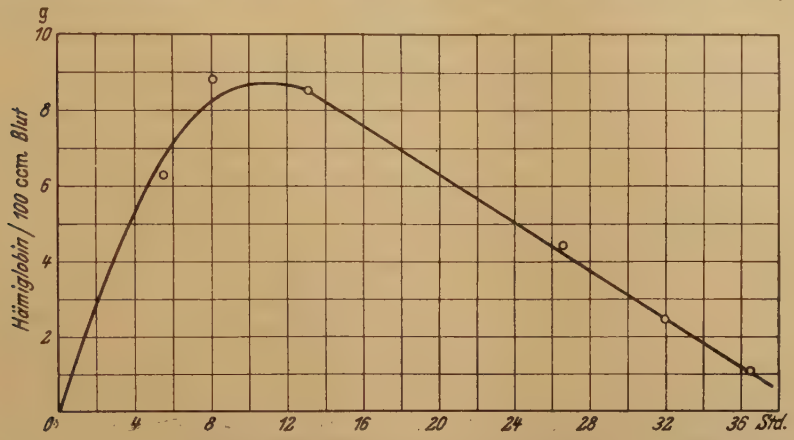


Abb. 10. Ablauf der Änderung des Hämiglobingehaltes unter der Wirkung von m-Dinitrobenzol. Hund K 33, 17,2 kg. 10 mg/kg m-Dinitrobenzol in Olivenöl subkutan injiziert. Gesamthämoglobingehalt des Blutes 17%.

bei den Tieren in den ersten Tagen nach der Vergiftung häufig Krämpfe auftraten, die manchmal mehrere Tage anhielten. In den ersten beiden Tagen entwickelte sich auch mit der Bildung von Heinzschen Körperchen an 60—80% der roten Zellen eine Anämie, die erst im Lauf von 3 oder mehr Wochen wieder geheilt wurde.

Die Farbstoffe wurden während des Anstiegs der Hämiglobinkonzentration im allgemeinen 4 Stunden nach dem m-Dinitrobenzol intravenös injiziert. Durch die stark wirksamen Farbstoffe wurde der Anstieg des Hämiglobingehaltes sofort unterbrochen und der Hämiglobingehalt innerhalb 10—15 Min. auf Werte von 1% oder darunter gesenkt. Diese Wirkung ist in Abb. 11 veranschaulicht. Im Laufe von vier Stunden nach Verabreichung von 10 mg/kg m-Dinitrobenzol stieg der Hämiglobingehalt auf 4,2% an. Dann wurden 10 mg/kg Toluidinblau intravenös injiziert. Bei der nächsten Hämiglobinbestimmung 15 Min. später betrug der Hämiglobingehalt nur 0,5%. Nach einer Stunde begann der Hämiglobingehalt jedoch wieder langsam anzusteigen, erreichte nach 4—8 Stunden den gleichen Wert wie unmittelbar vor der Farbstoffinjektion, stieg aber auch später nicht mehr auf Werte an, wie sie zu den entsprechenden Zeiten in Versuchen ohne

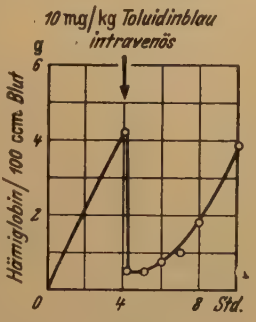


Abb. 11. Einfluß von Toluidinblau auf die Reduktion des Hämiglobins während der Wirkung von m-Dinitrobenzol. Hund 9,5 kg. 10 mg/kg m-Dinitrobenzol in Mohnöl gelöst subkutan injiziert. Nach 4 Stunden 10 mg/kg Toluidinblau intravenös injiziert. Gesamthämoglobin 10,1%.

Farbstoffanwendung beobachtet wurden. Erhöhung der Farbstoffdosis auf 20 mg/kg verlängerte die Wirkung, schob also den Wiederanstieg des Hämiglobins hinaus. Dosen von 5 mg/kg senkten den Hämiglobingehalt oft auch auf etwa 1%. Die Wirkung hielt aber nicht so lange an wie bei der doppelten Dosis. Die Wirkung des Farbstoffs läßt sich unter diesen Versuchsbedingungen nicht durch eine oder wenige Zahlen so beschreiben wie nach der Hämiglobinbildung durch Nitrit. Wir müssen sie darum durch die Darstellung des Versuchs in einer Kurve veranschaulichen, wenn sie von der eben gegebenen Beschreibung abweicht. Mit Kresylblau wurde die gleiche Wirkung erzielt wie mit Toluidinblau. Das Methylenblau schien ein wenig schwächer zu wirken. Es würde jedoch einer größeren Zahl von Versuchen bedürfen, um den Unterschied quantitativ festzulegen. Schwächer als die Wirkung dieser Farbstoffe war die des Thionins. Nach der Injektion von Thionin verlief die Reduktion nicht so schnell und es wurden auch nicht so niedrige Konzentrationen des Hämiglobins erreicht wie mit den anderen Farbstoffen (Abb. 12). Dieser Unterschied wurde durch eine größere Zahl von Versuchen mit Thionin einwandfrei ermittelt. In 11 Versuchen, in denen 4 Stunden nach 10 mg/kg m-Dinitrobenzol 10 mg/kg Thionin intravenös injiziert wurden, konnte die Hämiglobinkonzentration nicht einmal unter 1% und nur in 2 Versuchen unter 2% gesenkt werden.

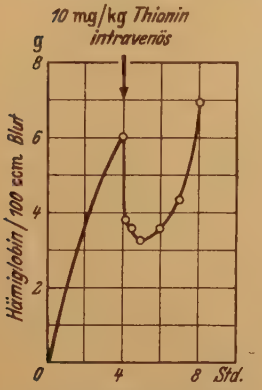


Abb. 12. Wirkung von Thionin auf die Reduktion des Hämiglobins während der Wirkung von m-Dinitrobenzol. Hund 15,6 kg. 10 mg/kg m-Dinitrobenzol in Mohnöl gelöst subkutan. Nach 4 Stunden 10 mg/kg Thionin intravenös. Gesamthämoglobin 13,5%.

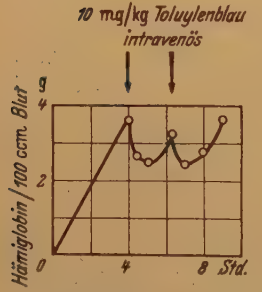


Abb. 13. Einfluß von Toluylenblau auf die Reduktion des Hämiglobins während der Wirkung von m-Dinitrobenzol. Hund 13 kg. 10 mg/kg m-Dinitrobenzol in Mohnöl gelöst subkutan. Nach 4 und $6^1/_2$ Stunden je 10 mg/kg Toluylenblau intravenös.

In je einem Versuch wurden auch Toluylenblau und Nilblau geprüft. Toluylenblau senkte in einer Dosis von 10 mg/kg die Hämiglobinkonzentration nur sehr wenig (Abb. 13). Die Wirkung des Toluylenblaus ist in dem wiedergegebenen Versuch als besonders schwach anzunehmen, da die Hämiglobinbildung ungewöhnlich gering war. Nilblau war auch hier sehr wenig wirksam. Eine Dosis von 6 mg/kg vermochte den Anstieg der Hämiglobinkonzentration nur für kurze Zeit ein wenig zu verzögern.

Wiederholung der Farbstoffinjektion nach einigen Stunden, wenn die Hämiglobinkonzentration wieder angestiegen war, hatte die gleiche oder nur wenig geringere Wirkung wie die erste (Abb. 14). Durch stündliche Injektion kleiner Dosen eines stark wirksamen Farbstoffs gelang es schließlich, den Hämiglobingehalt

beinahe konstant niedrig zu halten. In dem Versuch der Abb. 15 wurde 4 Stunden nach der Injektion von 10 mg/kg m-Dinitrobenzol, nachdem der Hämiglobingehalt auf 3,8% angestiegen war, stündlich 5 mg/kg Kresylblau intravenös injiziert und damit der Hämiglobingehalt zwischen 0,5 und 1% gehalten. Andere solche Versuche verliefen ähnlich, oder es kam im Laufe von Stunden zu einem geringen Anstieg der Hämiglobinkonzentration um etwa 1%.

Statt der wiederholten intravenösen Injektion konnte der ständige Verlust an Farbstoff durch Ausscheidung auch durch fortlaufende Resorption ergänzt werden. Durch orale Verabreichung von 200 mg/kg Methylenblau 4 Stunden nach der Injektion des Dinitrobenzols konnte eine ähnliche

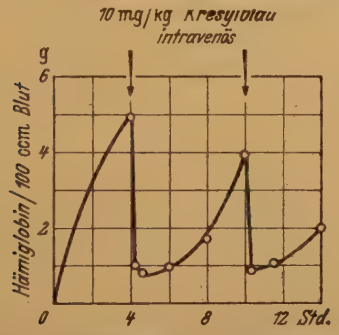


Abb. 14. Wiederholung der Farbstoffinjektion während der Hämiglobinbildung durch m-Dinitrobenzol. Hund 8 kg. 10 mg/kg m-Dinitrobenzol in Mohnöl gelöst subcutan. Nach 4 und 10 Stunden je 10 mg/kg Kresylblau intravenös.

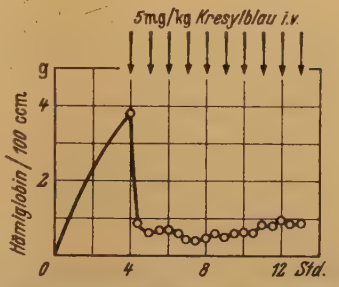


Abb. 15. Langdauernde Senkung des Hämiglobingehaltes durch häufige Injektion kleiner Mengen Kresylblau während der Hämiglobinbildung durch m-Dinitrobenzol. Hund 26,2 kg. 10 mg/kg m-Dinitrobenzol in Mohnöl gelöst subcutan. Nach 4 Stunden stündlich (beim Pfeil) je 5 mg/kg Kresylblau intravenös.

Wirkung wie durch wiederholte intravenöse Injektion kleiner Dosen erreicht werden. Der Abfall der Hämiglobinkonzentration verlief jedoch langsamer. Bei mehreren Tieren mißglückte der Versuch, weil die Farbstoffe infolge ihrer lokal reizenden Wirkung von den Tieren nach der Eingabe großer Dosen mit der Schlundsonde wieder erbrochen wurden.

Wurden den Hunden 20 mg/kg m-Dinitrobenzol verabreicht statt 10 mg/kg, so stieg die Hämiglobinkonzentration schneller und höher an. Im Mittel wurden Konzentrationen von $10{,}2 \pm 0{,}4$ g/100 ccm erreicht. Der Höchstwert der Hämiglobinkonzentration wurde im Durchschnitt nach 13 Stunden erreicht. Im schnellen Anstieg der Hämiglobinkonzentration war die durch 10 mg/kg eines stark wirksamen Farbstoffs erreichbare Senkung der Hämiglobinkonzentration geringer und von kürzerer Dauer. Durch wiederholte Injektionen von Farbstoff gelang es jedoch, die Hämiglobinkonzentration wesentlich niedriger zu halten, als sie ohne die Anwendung des Farbstoffs gewesen wäre. Ein geringer Anstieg, der etwa der unbeeinflußten Hämiglobinbildung parallel lief, war nicht zu verhindern. In

Abb. 16 ist ein Versuch wiedergegeben, in dem bereits eine Stunde nach der Injektion von 20 mg/kg m-Dinitrobenzol mit der Injektion von Methylenblau in Dosen von 10 mg/kg in stündlichen Abständen begonnen wurde. Zu der Zeit, als sich die Dinitrobenzolwirkung bereits ihrem Maximum näherte, konnte die Hämiglobinkonzentration durch Methylenblau noch zwischen 2 und 4% gehalten werden, während sie ohne Anwendung des Farbstoffs sich zwischen 9 und 11% bewegte.

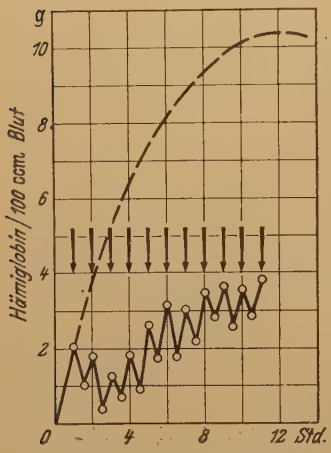


Abb. 16. Wirkung von Methylenblau auf die Reduktion des Hämiglobins während der Wirkung großer Dosen m-Dinitrobenzol. Hund 18 kg. 20 mg je kg m-Dinitrobenzol in Mohnöl gelöst subcutan. Nach einer Stunde und weiter in Abständen von einer Stunde (beim Pfeil) intravenöse Injektion von je 10 mg/kg Methylenblau. Die gestrichelte Kurve deutet an, wie die Hämiglobinbildung ohne Anwendung von Farbstoffen wahrscheinlich verlaufen würde.

Durch die Anwendung von Farbstoffen konnte die Wirkung hämiglobinbildender Stoffe wesentlich modifiziert werden. Bei einer Dosis eines solchen Stoffes, die ein Tier durch Oxydation von 70—80% seines Hämoglobins zu Hämiglobin tötete, konnte die Hämiglobinkonzentration so niedrig gehalten werden, daß Sauerstoffmangel keine entscheidende Bedeutung haben konnte. Wir haben die Farbstoffwirkung geradezu als Methode zur Analyse der Wirkung hämiglobinbildender Stoffe benutzt, um zu prüfen, welcher Anteil der Hämiglobinbildung besonders bei der tödlichen Wirkung solcher Stoffe zukommt.

Bei der Wirkung des m-Dinitrobenzols wurde keine der anderen Wirkungen wie Bildung von HEINZschen Körperchen und anschließende Entwicklung einer Anämie, Auftreten von Krämpfen, Anstieg des Serumeisens und tödliche Wirkung, sondern nur die Höhe der Hämiglobinkonzentration von den Farbstoffen beeinflußt. So konnte nach Dosen von 20 oder 30 mg/kg m-Dinitrobenzol durch die Anwendung von Farbstoffen der innerhalb 24 Stunden, wohl im wesentlichen infolge der Anoxie eintretende Frühtod verhindert werden, nicht aber der Spättod.

V. Einfluß von Ascorbinsäure auf die Reduktion des Hämiglobins.

Bei Untersuchungen über die Reaktion von Hämoglobin bzw. Hämiglobin mit Ascorbinsäure und Sauerstoff hatten wir beobachtet, daß Ascorbinsäure Hämiglobin zu reduzieren vermag[4, 25]. Die Ergebnisse jener Untersuchungen ließen es aber unwahrscheinlich erscheinen, daß Ascorbinsäure bei der Reduktion des Hämiglobins in roten Zellen mitwirkt. Wir hatten Gelegenheit, die Wirksamkeit der Ascorbinsäure auch

[25] KIESE, M. u. H. KAESKE: Biochem. Z. 312, 121 (1942).

noch am Tier zu prüfen. Hunden wurden 2—4 Tage lang Dosen von 30—300 mg/kg Ascorbinsäure als Natriumsalz intravenös injiziert. Am folgenden Tage erhielten sie 20 mg/kg m-Dinitrobenzol subcutan und nochmal die gleiche Dosis Ascorbinsäure wie an den Tagen vorher. Der durch m-Dinitrobenzol ausgelöste Anstieg der Hämiglobinkonzentration wurde von der Ascorbinsäure nicht beeinflußt. Die Hämiglobinkonzentration stieg im Durchschnitt auf $9{,}7 \pm 0{,}5$ g/100 ccm an.

Die Versuche in vivo bestätigen also die aus den Untersuchungen in vitro gezogenen Schlüsse.

VI. Die Toxizität der Farbstoffe.

Im Hinblick auf die therapeutische Verwendung der Farbstoffe zur Beschleunigung der Reduktion des Hämiglobins haben wir Toxizitätsbestimmungen durchgeführt. An Ratten wurde die mittlere tödliche Dosis bestimmt. Für die Beurteilung wurden ferner die bei der Anwendung der Farbstoffe an Hunden auftretenden toxischen Wirkungen berücksichtigt.

Tabelle 7. *Mittlere tödliche Dosis (DL_{50}) einiger Farbstoffe für Ratten.* Farbstoff zu 2—3% in 0,9%iger Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert, Ergebnis nach 24 Stunden abgelesen. Streuung ± 30 mg/kg.

Farbstoff	DL_{50} mg/kg
Thionin	215
Toluidinblau	215
Kresylblau	215
Methylenblau	180
Capriblau	175

Wegen Mangel an Tieren beschränkten wir uns bei den weniger stark in vivo katalytisch wirksamen Farbstoffen und den stark toxischen auf eine ganz grobe Ermittlung des Bereiches der mittleren tödlichen Dosis. Mit den stark wirksamen Oxazin- und Thiazinfarbstoffen wurden genauere Toxizitätsbestimmungen an Ratten durchgeführt. Die Ergebnisse der Bestimmungen mit größeren Tiergruppen sind in Tabelle 7 wiedergegeben. Die Farbstoffe, für die nur mit wenigen Tieren die Größenordnung der mittleren tödlichen Dosis ermittelt wurde, sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Tabelle 8. *Ungefähre mittlere tödliche Dosis einiger Farbstoffe für Ratten.*

Farbstoff	Ungefähre mittlere Dosis mg/kg
Bindschedlers Grün	140
Toluylenblau	140
2-Methyl-1,4-naphthochinon	70
Nilblau	80

Die Toxizität von Toluidinblau, Kresylblau und Thionin ist gleich und beträgt $DL_{50} = 215$ mg/kg. Methylenblau und Capriblau sind ein wenig toxischer als die anderen Farbstoffe. Die Abweichung liegt eben außerhalb der Streuung, die bei den verschiedenen Farbstoffen ähnlich war und $\sigma = \pm 30$ mg/kg betrug. Nilblau wirkte bereits in einer

wesentlich kleineren Dosis tödlich. Bei orientierenden Bestimmungen wurde die mittlere tödliche Dosis von Toluylenblau und Bindschedlers Grün ebenfalls kleiner als die von Toluidinblau u. a. gefunden. Die Naphthochinone waren weit toxischer als alle anderen Verbindungen und waren auch darum zur Beschleunigung der Reduktionsgeschwindigkeit des Hämiglobins in vivo unbrauchbar.

Die intravenöse Injektion der weniger toxischen Farbstoffe zur Beschleunigung der Reduktion des Hämiglobins wurde meist ohne Störung von den Hunden ertragen. Thionin schien am stärksten zentral erregend zu wirken. Nach der Anwendung von m-Dinitrobenzol zur Hämiglobinbildung löste die Injektion von Thionin häufiger Störungen wie Erbrechen und Taumeln aus als die anderen Farbstoffe. Toluidinblau und Kresylblau wurden sehr gut vertragen. Die intravenöse Injektion von 10 mg/kg Toluylenblau und noch mehr die von Bindschedlers Grün machte die Hunde taumelig und schläfrig. Auch Nilblau hatte in Dosen von 5—10 mg/kg bereits zentral lähmende Wirkungen.

Besprechung.

Die katalytische Wirkung der Farbstoffe auf die Reduktion des Hämiglobins ist auch bei Gegenwart von Sauerstoff in vitro und in vivo vorhanden, doch sind Unterschiede in der Wirkung gegenüber der Wirksamkeit bei Abwesenheit von Sauerstoff nachzuweisen. Insbesondere sind die Naphthochinone, die bei Abwesenheit von Sauerstoff zu den stärkst wirksamen Katalysatoren gehören, in Gegenwart von Sauerstoff nur sehr wenig wirksam, und Bindschedlers Grün ist in Gegenwart von Sauerstoff ganz unwirksam. Die Aufklärung dieses Unterschiedes brachte die Untersuchung der Hämiglobinbildung durch die Farbstoffe in Gegenwart von Sauerstoff. Alle von uns untersuchten Farbstoffe oxydieren bei Abwesenheit reduzierender Fermente oder Substrate Hämoglobin zu Hämiglobin. Wenn andere Autoren[26] diese Wirkung beim Thionin nicht beobachteten, so lag das daran, daß die Reduktion des Hämiglobins in ihren Versuchen nicht ausgeschaltet wurde. Die Reaktion verläuft aber nicht etwa in einfacher Abhängigkeit von der Hämoglobin- und Farbstoffkonzentration zu einer vollständigen Oxydation des Hämoglobins zu Hämiglobin, sondern verlangsamt sich mit wachsender Hämiglobinkonzentration sehr stark. Kinetisch ist diese Tatsache so zu verstehen, daß mit wachsender Hämiglobinkonzentration eine Gegenreaktion genügend große Geschwindigkeit erreicht, den Anfall von Hämiglobin in der Primärreaktion Hb^{II} + Farbstoff → Hb^{III} + Leukofarbstoff wieder zu reduzieren. Diese Gegenreaktion ist Hb^{III} + Leukofarbstoff → Hb^{II} + Farbstoff. Mit steigender Hämiglobinkonzentration erreicht diese Reaktion immer größere Bedeutung, da ihre Reaktionskonstante erheblich größer ist, als die der Reaktion Leukofarbstoff + O_2 → Farbstoff. Die gegenüber den anderen Farbstoffen sehr

[26] GROSCURTH, G. u. R. HAVEMANN: Dtsch. med. Wschr. **1935 II**, 1629.

schnelle und weitgehende Hämiglobinbildung durch Bindschedlers Grün und Naphthochinon macht es verständlich, daß diese Farbstoffe die Abnahme der Hämiglobinkonzentration in roten Zellen bei Anwesenheit von Sauerstoff nicht beschleunigen. Diese Verbindungen beschleunigen die Reduktion des Hämiglobins in Gegenwart von Sauerstoff wohl ebenso wie in dessen Abwesenheit, doch wird diese Wirkung ganz oder zum Teil durch die gleichzeitige Bildung von Hämiglobin wieder ausgeglichen. Bei den Oxazin- und Thiazinfarbstoffen ist die Hämiglobinbildung so langsam, daß sie in der roten Zelle die starke Beschleunigung der Reduktion des Hämiglobins nur wenig zu vermindern vermag. Werden diese Farbstoffe roten Zellen zugesetzt, die Glukose zur Verfügung haben, so wird die Hämiglobinkonzentration nicht erhöht. Es wird zwar vom Sauerstoff Hämiglobin gebildet, aber dieses wird noch schneller wieder reduziert. Bindschedlers Grün und weit weniger Naphthochinon erhöhen jedoch die Hämiglobinkonzentration in roten Zellen auch bei Gegenwart von Glukose.

Tabelle 9. *Oxydations-Reduktionspotentiale verschiedener Farbstoffe bei* p_H 7.

Farbstoff	Oxydations-Reduktionspotential ν
Nilblau	— 0,120
Methylenblau	+ 0,011
Toluidinblau	+ 0,011
1,4-Naphthochinon	+ 0,036
Kresylblau	+ 0,047
Thionin	+ 0,060
Toluylenblau	+ 0,115
1,2-Naphthochinon	+ 0,185
Bindschedlers Grün	+ 0,224

Die verschiedene Geschwindigkeit und das verschiedene Ausmaß der Hämiglobinbildung durch die Farbstoffe haben neben thermodynamischen Gründen, die in den verschiedenen Oxydations-Reduktionspotentialen der einzelnen Farbstoffe gegeben sind, noch unbekannte kinetische Ursachen. Denn eine Zusammenstellung der Oxydations-Reduktionspotentiale der angewandten Farbstoffe in Tabelle 9 läßt leicht erkennen, daß die Geschwindigkeit der Hämiglobinbildung durch die verschiedenen Farbstoffe einer anderen Ordnung folgt als ihre Oxydations-Reduktionspotentiale.

Neben der Bildung von Hämiglobin wird die katalytische Wirkung der Farbstoffe durch die Reaktion der reduzierten Farbstoffe mit Sauerstoff beeinträchtigt. Diese Reaktion verläuft bei allen Farbstoffen, wenn sie im Überschuß vorhanden sind, fast gleich schnell, so daß durch diese Reaktion keine grundsätzliche Änderung im Verhältnis der Wirkung der einzelnen Farbstoffe auf die Reduktion des Hämiglobins geschaffen wird.

Die Tatsache, daß alle Farbstoffe im Überschuß die Sauerstoffaufnahme der roten Zellen fast gleich stark erhöhen, spricht dafür, daß die Farbstoffe unmittelbar mit der Hämiglobinreduktase reagieren und nicht nur auf dem Wege über die Bildung von Hämiglobin. In diesem Falle sollte nämlich die Steigerung des Sauerstoffverbrauchs entsprechend der verschiedenen Geschwindigkeit der Oxydation des Hämoglobins zu Hämiglobin durch die Farbstoffe verschieden sein. Als ein Nebenweg verläuft aber sicher die Reaktionskette Sauerstoff-Farbstoff-Hämoglobin-Farb-

stoff-Hämiglobinreduktase neben dem Hauptweg Sauerstoff-Farbstoff-Hämiglobinreduktase. Diese Befunde und Deutungen entsprechen den Anschauungen, zu denen WARBURG[12, 20] und WENDEL[13] auf anderem Wege auch gekommen waren.

Während die Steigerung der Sauerstoffaufnahme durch die verschiedenen Farbstoffe fast gleich stark war, beschleunigten sie bei Ausschluß von Sauerstoff die Reduktion des Hämiglobins in gleicher Konzentration sehr ungleich[4]. Demnach muß die Reaktion des von der Hämiglobinreduktase reduzierten Farbstoffs mit dem Hämiglobin für die Geschwindigkeit der katalysierten Reduktion des Hämiglobins wesentlich mitbestimmend sein. Bei hohen Farbstoffkonzentrationen ist für die Steigerung der Atmung der roten Zellen die Reaktion des reduzierten Farbstoffs mit dem molekularen Sauerstoff nicht geschwindigkeitsbestimmend, da immer genügend oxydierter Farbstoff vorhanden ist. Geschwindigkeitsbestimmend ist die Reduktion des Farbstoffs. Wenn nun bei der katalytischen Wirkung auf die Reduktion des Hämiglobins erhebliche Unterschiede zwischen den Farbstoffen gefunden werden, so müssen diese auf ungleiche Reaktionsgeschwindigkeiten des Hämiglobins mit dem reduzierten Farbstoff beruhen.

Die bei allen Reaktionen — Oxydation des Hämoglobins, Steigerung der Sauerstoffaufnahme und Beschleunigung der Reduktion des Hämiglobins — beobachtete Beziehung zwischen Farbstoffkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit weist darauf hin, daß der Farbstoff eine Oberfläche sättigt und nur in dieser wirksam ist. Die Art dieser Oberfläche ist nicht genauer zu definieren. Sowohl bei der Oxydation von Hämoglobin zu Hämiglobin wie bei der Beschleunigung der Reduktion des Hämiglobins könnte man eine Verbindung zwischen Farbstoff und Hämoglobin annehmen. Die Steigerung der Sauerstoffaufnahme roter Zellen ist in gleicher Weise von der Konzentration des Farbstoffs abhängig. Vielleicht kommt hier auch nur der an das Hämoglobin gebundene Farbstoff zur Wirkung, obwohl das Hämoglobin selbst nur in geringem Maße in die Reaktion einbezogen wird.

In der katalytischen Wirkung der einzelnen Farbstoffe auf die Reduktion des Hämiglobins in vivo ergibt sich eine ähnliche Abstufung wie bei der Wirkung in vitro in Gegenwart von Sauerstoff, allerdings treten hier noch einige modifizierende Bedingungen hinzu. Zunächst ist die außerordentlich starke Wirkung der Farbstoffe auffällig, die die in vitro beobachtete Beschleunigung der Reduktion des Hämiglobins in roten Zellen vom Hunde[21] weit übertrifft. Dabei ist noch zu berücksichtigen, daß bei intravenöser Injektion des Farbstoffs infolge der Bindung der Farbstoffe in den verschiedensten Geweben die maximal wirksame Konzentration im Blute nur sehr kurze Zeit vorhanden ist. Ob die Abfuhr von Reaktionsprodukten oder Anwesenheit noch unbekannter Substrate und Reaktionen oder der Fortfall der Behandlung der roten Zellen in vitro mit Nitrit und die Waschungen oder — was fast am wahrscheinlichsten ist — eine zusätzliche Reduktion von Farbstoff im Gewebe Ursache dieses Unter-

schieds in der Farbstoffwirkung sind, bedarf noch weiterer Klärung. Jedenfalls ist die besonders starke katalytische Wirkung der Farbstoffe in vivo für ihre praktische Anwendung besonders günstig.

Die Untersuchung der katalytischen Wirkung am Tier engt die Zahl der stark wirksamen und therapeutisch brauchbaren Farbstoffe noch weiter ein. Nilblau und die Naphthochinone sind viel toxischer als Toluidinblau, Kresylblau, Thionin und Methylenblau und können daher nur in geringen, wenig wirksamen Dosen angewandt werden. Toluylenblau ist ebenfalls toxischer als die zuletzt genannten Farbstoffe und hat außerdem auch in vivo nur schwache katalytische Wirkung. Die Gruppe Toluidinblau, Kresylblau, Methylenblau, Thionin und Capriblau ist in der katalytischen Wirkung auch in vivo sehr ähnlich. In der Toxizität sind geringe Unterschiede vorhanden. Capriblau und Methylenblau haben eine etwas geringere mittlere tödliche Dosis. Die Werte des Methylenblaus und Capriblaus liegen eben außerhalb der Streuung der anderen. Wir fanden keinen so großen Unterschied in der Toxizität von Thionin und Methylenblau wie Hauschild[3], der nach Versuchen an je 6 Ratten für Thionin 100 mg/kg und für Methylenblau 50 mg/kg angibt. Nach unseren Untersuchungen an je 40 Tieren ist die Toxizität beider Farbstoffe wesentlich geringer.

In der Toxizität der untersuchten Oxazin- und Thiazinfarbstoffe scheint ein Einfluß gewisser Strukturen der Moleküle nachweisbar zu sein. Die an beiden Stickstoffatomen zweifach methylierten Verbindungen (Methylenblau und Capriblau) sind toxischer als die nur an einem Stickstoffatom oder gar nicht methylierten (Toluidinblau, Kresylblau, Thionin).

Eine weitere Differenzierung in der Gruppe der in vivo stark wirksamen Farbstoffe erlaubten die Versuche, bei denen Hämiglobin durch m-Dinitrobenzol gebildet wurde. Hier erwies sich Thionin zunächst in seiner Wirkung auf die Reduktion des Hämiglobins gegenüber dem Toluidinblau, Kresylblau und Methylenblau unterlegen und rief auch stärkere zentrale Erregung hervor als die genannten Farbstoffe.

Der Vergleich der Wirkungsstärke, Wirkungsdauer, Toxizität und Löslichkeit läßt Toluidinblau und Kresylblau als die zweckmäßigsten Farbstoffe zur therapeutischen Verminderung von Hämiglobin im Blute erscheinen. Wir bevorzugen darum diese Farbstoffe, wenn bei der pharmakologischen Analyse eines Stoffes die Anreicherung von Hämiglobin ausgeschaltet werden soll. Freilich zeigen die hier beschriebenen Untersuchungen, daß diese Farbstoffe sich in ihrer Wirkung vom Methylenblau und Thionin nicht sehr stark unterscheiden. Ein Vergleich der Wirkung und Verträglichkeit der vier Farbstoffe am Menschen erscheint immerhin wünschenswert.

Zusammenfassung.

Die Wirkung von 1,2-Naphthochinon, 2-Methyl-1,4-naphthochinon, Thionin, Toluidinblau, Methylenblau, Kresylblau, Capriblau, Nilblau,

Toluylenblau und Bindschedlers Grün auf die Reduktion des Hämiglobins in den roten Zellen wird untersucht.

Hämoglobin außerhalb der roten Zellen wird von allen Farbstoffen in Gegenwart von Sauerstoff zu Hämiglobin oxydiert. Die Reaktionsgeschwindigkeit nähert sich mit steigender Farbstoffkonzentration einem Grenzwert. Die Reaktionsgeschwindigkeit und der vom Farbstoff oxydierte Anteil des Hämoglobins war bei den einzelnen Farbstoffen verschieden. Die Naphthochinone und Bindschedlers Grün reagierten am schnellsten mit dem Hämoglobin.

Alle untersuchten Farbstoffe steigerten den Sauerstoffverbrauch roter Zellen, deren Hämiglobingehalt nicht vermehrt war. Die Wirkung erreichte mit steigender Farbstoffkonzentration einen Grenzwert. Die maximale Wirkung der verschiedenen Farbstoffe war nur wenig verschieden.

Die Reduktion des Hämiglobins wurde durch die Farbstoffe auch in Gegenwart von Sauerstoff beschleunigt. Doch war Bindschedlers Grün gar nicht und die Naphthochinone nur sehr wenig wirksam. Die Wirksamkeit des Toluidinblaus, Thionins, Nilblaus, Kresylblaus, Capriblaus und Methylenblaus war praktisch gleich.

Die Reduktion des Hämiglobins in vivo wurde durch die Farbstoffe noch stärker beschleunigt als in vitro. Durch intravenöse Injektion von 10 mg/kg Toluidinblau konnte beim Hunde die Reduktion des Hämiglobins mehr als 10fach beschleunigt werden. Das Verhältnis der Wirkungsstärke der einzelnen Farbstoffe war ähnlich wie bei der Reduktion des Hämiglobins in vitro in Gegenwart von Sauerstoff. Die stark wirksamen Farbstoffe ließen sich noch ein wenig differenzieren. Toluidinblau war am wirksamsten und Kresylblau den anderen noch ein wenig überlegen.

Wurde Hämiglobin in vivo durch Nitrit gebildet, so konnte es durch Anwendung eines Farbstoffs endgültig beseitigt werden. Unter der Wirkung eines langdauernd wirkenden hämiglobinbildenden Stoffes wie m-Dinitrobenzol konnte die Wirkungsdauer der Farbstoffe ermittelt werden. Durch intravenöse Injektion von 10 mg/kg eines stark wirksamen Farbstoffs konnte während der Wirkung von m-Dinitrobenzol die Hämiglobinkonzentration für etwa 2 Stunden unter 1 g in 100 ccm Blut gesenkt werden. Danach stieg sie langsam wieder an, und nach 4—6 Stunden war die Farbstoffwirkung beendet. Durch wiederholte Injektion von Farbstoff konnte die Hämiglobinkonzentration während der Dauer der Wirkung des m-Dinitrobenzols auf Werten zwischen 1—2% gehalten werden.

Ascorbinsäure beschleunigte die Reduktion des Hämiglobins in vivo nicht.

Toxizitätsbestimmungen an Ratten ergaben für Toluidinblau, Thionin und Kresylblau eine mittlere tödliche Dosis von 215 mg/kg bei intraperitonealer Injektion, für Methylenblau 180 mg/kg und für Capriblau 175 mg/kg. Die übrigen Farbstoffe waren stärker toxisch.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Der Hämiglobingehalt normalen Blutes.

Von

Wolfgang Heubner, Manfred Kiese, Margarete Stuhlmann und Waltraud Schwartzkopff-Jung.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 4. März 1945.)

Während der Nachweis hoher Konzentrationen von Hämiglobin (Methämoglobin) im Blute und auch ihre Bestimmung neben Hämoglobin etwa nach dem von Vierordt[1] und Hüfner[2] angewandten Verfahren der Bestimmung zweier Farbstoffe durch Extinktionsmessung bei zwei verschiedenen Wellenlängen schon lange keine Schwierigkeiten bot, konnte der Nachweis von Hämiglobin in normalem Blute bisher nicht mit Sicherheit geführt werden. Mehrere Tatsachen sprechen dafür, daß Hämiglobin in niedriger Konzentration im Blute vorhanden ist. Einerseits reagiert Hämoglobin mit Sauerstoff unter Bildung von Hämiglobin. Die Kinetik dieser Reaktion ist weitgehend bekannt (Neill und Hastings[3], sowie Brooks[4]). Andererseits verläuft die Reduktion des Hämiglobins in den roten Zellen langsam (Heubner[5], Kiese[6]); insbesondere nimmt die Geschwindigkeit der enzymatischen Reduktion unterhalb einer Konzentration von 1—2% Hämiglobin mit der Konzentration erheblich ab (Kiese[6]). Die aus diesen beiden Reaktionen resultierenden geringen Hämiglobinkonzentrationen neben der hohen Konzentration von Hämoglobin waren einer photometrischen Bestimmung erst zugänglich, als empfindliche indirekte Verfahren ausgearbeitet waren. Die manometrische Methode zur Hämiglobinbestimmung (Nicloux und Fontès[7], van Slyke und Hiller[8]), die das Hämiglobin als Differenz des Kohlenoxydbindungsvermögens des Blutes vor und nach Reduktion des Hämiglobins bestimmt, reicht ebenfalls in ihrer Genauigkeit nicht aus, die geringen Hämiglobinkonzentrationen zu erfassen. Ein sehr empfindliches indirektes photometrisches Verfahren zur Hämiglobinbestimmung haben Evelyn und

[1] Vierordt, K.: Die quantitative Spektralanalyse. Tübingen 1876. — [2] Hüfner, G.: Arch. Anat. u. Physiol. (Leipz.) **1900**, 39. — [3] Neill, J. u. A. B. Hastings: J. biol. Chem. (Am.) **63**, 479 (1925). — [4] Brooks, J.: Proc. Roy. Soc. London (B) **109**, 35 (1932). — [5] Heubner, W.: Erg. Physiol. **43**, 9 (1940). — [6] Kiese, M.: Biochem. Z. **316**, 264 (1944). — [7] Nicloux, M. u. G. Fontès: Bull. soc. Chim. biol. (Fr.) **6**, 728 (1924). — [8] van Slyke, D. D. u. A. Hiller: J. biol. Chem. (Am.) **84**, 205 (1929).

Malloy[9], sowie Havemann, Jung und v. Issekutz jr.[10] ausgearbeitet. Es benutzt die Verminderung der Extinktion des Hämiglobins im Bereich von 610—650 mμ bei Überführung des Hämiglobins in Hämiglobincyanid zur Messung der Hämiglobinkonzentration. Da Hämoglobin unter den Versuchsbedingungen durch den Zusatz von Blausäure seine Extinktion nicht ändert, erlaubt das Verfahren die Hämiglobinbestimmung neben hohen Konzentrationen von Hämoglobin. Mit dieser Methode haben v. Issekutz jr., Schmid-Burgk und Hecht Messungen des Hämiglobingehaltes in normalem Blute durchgeführt. Die Ergebnisse hat Heubner[5] zusammengestellt (s. Tabelle 2 auf S. 316). Wir haben uns seither weiter mit der Bestimmung der geringen Hämiglobinkonzentration im normalen Blut beschäftigt und vor allem auch neue Verfahren benutzt, die auf anderen Reaktionen beruhen. Dadurch wird die Sicherheit, daß bei den Bestimmungen tatsächlich Hämiglobin erfaßt wird, wesentlich erhöht.

Bei diesen Untersuchungen ergab sich unter anderem, daß bei den ersten Messungen zwei Fehler nicht gehörig beachtet wurden, die einen zu hohen Hämiglobingehalt vortäuschen. Erstens nimmt in verdünnten Lösungen von hämolysiertem Blut der Hämiglobingehalt in kurzer Zeit bereits meßbar zu. Wir haben diesen Fehler bei den neuen Messungen dadurch beseitigt, daß wir die zu untersuchenden Blutproben in Wasser hämolysierten, das mit Kohlenoxyd gesättigt war. Dadurch war einerseits der Sauerstoff überhaupt entfernt und andererseits das Hämoglobin durch Bindung an Kohlenoxyd gegen Oxydation weitgehend geschützt. Zweitens tritt bei Zusatz von Cyanid zur gepufferten Blutlösung eine geringe Aufhellung ein, die nicht auf die Umwandlung von Hämiglobin in Hämiglobincyanid zurückzuführen ist. Sie läßt sich leicht nachweisen, indem man Cyanid zu der mit Kohlenoxyd gesättigten Blutlösung zusetzt, nachdem das Hämiglobin darin mit Dithionit reduziert worden ist. Dieser Einfluß des Cyanids auf die Lösung greift im wesentlichen an den in der Lösung enthaltenen Stromaten der roten Zellen an, deren Absorption und Dispersion sich offenbar ändert. Die Abtrennung der Stromata durch Zentrifugieren beseitigte den Effekt fast vollständig. Tatsächlich fanden wir nach Elimination der beiden Fehler auch mit der Cyanidmethode niedrigere Hämiglobinkonzentrationen als die früheren Autoren.

Ein wesentlicher Fortschritt in der Bestimmung der geringen normalen Hämiglobinkonzentrationen wurde durch Anwendung eines noch empfindlicheren Verfahrens ermöglicht. Kiese[11] gab eine photometrische Methode zur Bestimmung von Hämiglobin an, bei der die Zunahme der Extinktion der Lösung bei 546 und 577—79 mμ nach Überführung des Hämiglobins in Kohlenoxydhämoglobin gemessen wird. Entsprechend der größeren

[9] Evelyn, K. A. u. H. T. Malloy: J. biol. Chem. (Am). **126**, 655 (1938). — [10] Havemann, R., F. Jung, B. v. Issekutz jr.: Biochem. Z. **301**, 116 (1939). — [11] Kiese, M.: Dieser Band S. 190.

Empfindlichkeit der Methode konnten verdünntere Blutlösungen verwendet werden. Störungen durch Nebenreaktionen wurden dadurch ganz wesentlich vermindert.

Die dieser Methode zugrunde liegende Reaktion ermöglicht die Hämiglobinbestimmung auch noch in anderer Weise, nämlich durch Messung der *Abnahme* der Extinktion im roten Gebiet, die bei der Überführung von Hämiglobin in Kohlenoxydhämoglobin eintritt (KIESE[11]). So konnte durch die gleiche Reaktion die Hämiglobinkonzentration einerseits in einer Extinktionszunahme und andererseits in einer Extinktionsabnahme gemessen werden. Danach konnte mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß die gemessenen Effekte andere Ursachen als die Anwesenheit von Hämiglobin haben, zumal die ermittelten Hämiglobinkonzentrationen übereinstimmten. Der Einfachheit halber nennen wir im folgenden die Kohlenoxydmethode, die die Extinktionsänderung bei 546 und 577—79 mμ mißt, *grüne Kohlenoxydmethode* und die, welche die Extinktionsänderung im roten Gebiet mißt, die *rote Kohlenoxydmethode.*

Tabelle 1. *Mittlerer Hämiglobingehalt des Blutes verschiedener Tiere nach verschiedenen Methoden bestimmt.* Der Gehalt ist angegeben in g Hämiglobin in 100 ccm Blut.

Tierart	Kohlenoxyd grün	Kohlenoxyd rot	Cyanid
Mensch	0,09	—	0,11
Hund	0,12	0,13	0,16
Katze	0,12	0,13	0,14
Ratte	0,07	0,11	0,13
Kaninchen	0	0,03	0,04
Meerschweinchen	0,01	0,03	0,05

Schließlich wurden noch andere Reaktionen zur indirekten photometrischen Bestimmung des Hämiglobins herangezogen, nämlich die Überführung des Hämiglobins in das Hämiglobinazid und in das Hämiglobincyanat. Das Hämiglobinazid hat im roten Gebiet eine geringere Extinktion und Hämiglobincyanat eine etwas größere als Hämiglobin. Entsprechend dem geringeren Extinktionsunterschied dieser beiden Verbindungen von Hämiglobin sind die darauf gegründeten Methoden jedoch weniger empfindlich. Ihre Ergebnisse haben nur qualitative Bedeutung.

Die Ergebnisse von Messungen des Hämiglobingehaltes des Blutes verschiedener Tiere sind im einzelnen im Versuchsteil wiedergegeben. Hier in der Tabelle 1 sind die mit den verschiedenen Methoden erhaltenen Mittelwerte zusammengestellt. Wir haben uns dabei auf die empfindlicheren Methoden beschränkt, also auf die beiden Kohlenoxydmethoden und die Cyanidmethode. Zum Vergleich sind in Tabelle 2 die Ergebnisse der früheren Untersuchungen mit der Cyanidmethode wiedergegeben, die außer beim Hunde einen höheren Hämiglobingehalt ergaben. Bei der Bewertung dieser Ergebnisse mag auch berücksichtigt werden, daß einzelne Werte das Mittel nur sehr weniger Messungen sind.

Für die Bewertung der Hämiglobinkonzentrationen im normalen Blut ist der Anteil des Hämiglobins am Gesamthämoglobin von Interesse. In Tabelle 3 ist diese Beziehung angegeben. Die Hämiglobinkonzentration wurde als das Mittel aus den Messungen mit den Kohlenoxydmethoden und der Cyanidmethode angegeben.

Nach unseren Untersuchungen ist der Hämiglobingehalt des Blutes verschiedener Tierarten verschieden. Im Blute von Meerschweinchen und Kaninchen liegt die Hämiglobinkonzentration an der Grenze der Empfindlichkeit der Methoden und konnte nicht sicher bestimmt werden. Von den anderen untersuchten Tieren hatten Katze und Hund den höchsten, und Mensch und Ratte einen geringeren Hämiglobingehalt. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Tierarten entsprachen etwa den Unterschieden in der Geschwindigkeit der Reduktion des Hämiglobins in den roten Zellen der Tiere (Kiese und Weis[12]).

Tabelle 2. *Mittlerer Hämiglobingehalt des Blutes verschiedener Tiere nach früheren Untersuchungen mit der Cyanidmethode.*

Tierart	Hämoglobin g in 100 ccm Blut	Autor
Mensch . .	0,25	Schmid-Burgk
	0,25	Hecht *
Hund . . .	0,09	Hecht *
Katze . . .	0,96	v. Issekutz jr.
	0,29	Hecht *
Kaninchen	0,16	Schmid-Burgk
	0,18	Hecht *

Ob dem geringen Hämiglobingehalt des Blutes eine physiologische Bedeutung zukommt, ist bisher nicht zu entscheiden. Durch die dauernde

Tabelle 3. *Der Anteil des Hämiglobins am Gesamthämoglobin im Blute verschiedener Tiere.*

Tierart	Mittlerer Gesamthämoglobingehalt g/100 ccm Blut	Mittlerer Hämiglobingehalt g/100 ccm Blut	Anteil des Hämiglobins am Gesamthämoglobin %
Mensch	14,3	0,10	0,7
Hund	14,9	0,14	0,9
Katze	12,2	0,13	1,1
Ratte	12,3	0,10	0,8
Kaninchen	12,8	(0,02)	$< 0{,}2$
Meerschweinchen. .	12,7	(0,03)	$< 0{,}2$

Oxydation des Hämoglobins durch Sauerstoff zu Hämiglobin und dessen Reduktion wird in den roten Zellen ein beschränkter oxydativer Stoffwechsel unterhalten[6,13]. Das Hämiglobin im Blute hat aber eine gewisse

* Hechts Werte wurden bei Heubner[5] nur als Anteil des Hämiglobins am gesamten Blutfarbstoff angegeben. Die Hämiglobinkonzentration wurde daraus errechnet unter der Annahme von 15 g Gesamthämoglobin in 100 ccm Blut.

[12] Kiese, M. u. B. Weis: Arch. exper. Path. (D.) **202**, 493 (1943). — [13] Kiese, M. u. W. Schwartzkopff: Arch. exper. Path. (D.) **204**, 267 (1946).

pharmakologische Bedeutung. Heubner und Jung[14], sowie Reiter[15] haben gezeigt, daß die Reaktion zwischen Hämoglobin und Chlorat autokatalytisch verläuft. Es ist daher anzunehmen, daß das im Blute vorhandene Hämiglobin für den Ablauf der Hämiglobinbildung durch Chlorat von Bedeutung ist. Die charakteristischen Wirkungen des Chlorats auf den Blutfarbstoff werden wahrscheinlich durch das im Blute vorhandene Hämiglobin überhaupt erst ermöglicht.

Versuche.

1. Die Grundlagen der verschiedenen angewandten Methoden.

Um das Wesen der verschiedenen von uns benutzten Methoden und ihre Empfindlichkeit zu veranschaulichen, geben wir auf der Abb. 1 die

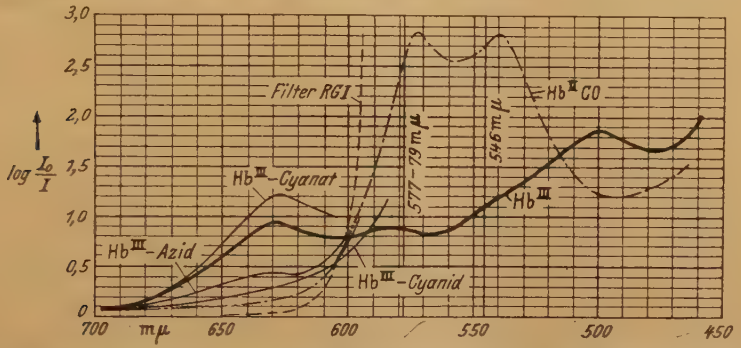


Abb. 1. Absorptionskurven der zur Analyse dienenden Farbstoffe, des gebrauchten Filters und Absorptionslinien des monochromatischen Quecksilberlichtes. Hb^{III} = Hämiglobin.

Extinktionskurven des Hämiglobins und der verschiedenen Verbindungen, in die es zur Messung übergeführt wurde, wieder. In die Abbildung sind ferner die gelben und die grüne Quecksilberlinie eingezeichnet, die bei der grünen Kohlenoxydmethode verwendet wurden, sowie die Extinktion des Filters RG 1, mit dem aus Glühlicht der Wellenlängenbereich zwischen 600 und 750 mμ für die anderen Methoden

Tabelle 4. *Vergleich der Empfindlichkeit der verschiedenen zur Hämiglobinbestimmung benutzten Verfahren.*

Die genannte Hämiglobinkonzentration gibt bei der betreffenden Methode in 20 mm Schichtdicke am Photometer einen Ausschlag von 10 Teilstrichen.

Methode	Hämiglobinkonzentration in g/100 ccm Lösung, die 10 Teilstrichen entspricht
Kohlenoxyd, grün. . .	0,0008
Kohlenoxyd, rot . . .	0,0038
Cyanid	0,0050
Azid	0,010
Cyanat	0,019

[14] Heubner, W. u. F. Jung: Schweiz. med. Wschr. **1941 I**, 247; Ber.-dtsch. chem. Ges. **75**, 1636 (1942). — [15] Reiter, Melchior: Versuche zur Theorie der Chloratvergiftung. Inaug.-Diss. Berlin 1944.

herausgefiltert wurde. Der Vergleich der Extinktionen im Bereich der zur Messung verwendeten Wellenlängen läßt erkennen, daß die grüne Kohlenoxydmethode bei weitem die empfindlichste ist. Die Verwendung von monochromatischem oder bichromatischem Licht engster Wellenlängenbereiche gibt ihr noch einen besonderen Vorzug. Die rote Kohlenoxydmethode ist nur wenig empfindlicher als die Cyanidmethode. Die Azid- und Cyanatmethode sind weniger empfindlich. Da bei der Verwendung nicht monochromatischen roten Lichtes noch andere Faktoren außer dem Extinktionsunterschied bei 630 mμ die Empfindlichkeit mitbestimmen, ist sie besser durch einen Vergleich der Hämiglobinkonzentration, die einer bestimmten Teilstrichzahl des Photometers entspricht, zu beurteilen. In Tabelle 4 sind entsprechende Daten enthalten.

2. Die Vorbereitung der Blutproben.

Für die Hämiglobinbestimmung mit der grünen Kohlenoxydmethode wurden 0,2 ccm Blut verwandt, für alle anderen Methoden 1,0 ccm. Das Blut wurde aus der Vene entnommen, mit wenig fein pulverisiertem Natriumcitrat ungerinnbar gemacht, und unverzüglich die genannten Mengen in etwa 80 ccm Wasser, das mit Kohlenoxyd gesättigt war, hämolysiert. Nach 5—10 Min. wurden 10 ccm einer 0,2 molaren Phosphatlösung vom p_H 6,8 zugesetzt und mit kohlenoxydhaltigem Wasser auf 100 ccm aufgefüllt. Die Lösungen wurden dann zur Abtrennung der Stromata zentrifugiert. Die für die Kohlenoxydmethoden verwandten Lösungen wurden nach dem Zentrifugieren nochmals mit Kohlenoxyd gesättigt und dann gut verschlossen gehalten, auch die Kuvetten wurden mit Stopfen verschlossen.

Zur Bestimmung des Gesamthämoglobins wurden 0,2 ccm Blut in kohlenoxydfreiem Wasser hämolysiert und nach Zusatz von 5 ccm Pufferlösung auf 50 ccm verdünnt.

3. Die Ausführung der Messungen und die Eichung.

Die weiteren Operationen bei den Messungen wurden nach den vorliegenden Beschreibungen der Cyanidmethode[9, 10, 16] und der Kohlenoxydmethode[11] durchgeführt. Die Messungen der Extinktionsänderung im roten Gebiet bei Überführung des Hämiglobins in Kohlenoxydhämoglobin, Hämiglobinazid oder Hämiglobincyanat wurden alle entsprechend der Cyanidmethode durchgeführt.

In allen Fällen wurde auch der Gesamthämoglobingehalt der untersuchten Blutproben bestimmt. Dazu wurde das Hämoglobin mit Ferricyanid zu Hämiglobin oxydiert, und dies dann mit der Cyanidmethode bestimmt.

---

[16] Kiese, M.: Klin. Wschr. **1942 I**, 565.

Zur Ermittlung der Hämiglobinkonzentration aus den gemessenen Extinktionen wurden für die verschiedenen Methoden Eichkurven mit Hämiglobinlösungen bekannter Konzentration, die aus mehrmals umkristallisiertem Pferdehämoglobin hergestellt waren, angefertigt. Da die Messung niedriger Konzentrationen von Hämiglobin neben hohen Konzentrationen von Kohlenoxydhämoglobin durchgeführt werden mußte, wurde bei der Anfertigung der Eichkurven jeweils der Kuvette mit der Hämiglobinlösung noch eine Kuvette vorgeschaltet, die Kohlenoxydhämoglobin in einer entsprechenden Konzentration enthielt. Der Einfluß des Kohlenoxydhämoglobins auf die Hämiglobinbestimmung war bei allen Methoden sehr gering.

Während die Stärke des monochromatischen Lichtes auf die Messungen mit der grünen Kohlenoxydmethode von belanglosem Einfluß war[11], mußte die Emission der Glühlampe, aus der rotes Licht mit den Filtern OG 3 + RG 1 herausgefiltert wurde, mit einem blauen Testfilter (BG 7) kontrolliert und durch Änderung eines der Lampe vorgelegten Widerstandes konstant gehalten werden (Havemann[17]).

4. Die Störung der Bestimmung niedriger Hämiglobinkonzentrationen durch die Stromata der roten Zellen.

Durch die Auflösung von Blut in Wasser tritt der Blutfarbstoff zwar aus den roten Zellen aus, doch bleiben die Stromata erhalten. Sie könnten durch Zusatz von Harnstoff aufgelöst werden, aber in Lösungen käuflicher Harnstoffpräparate tritt Hämiglobinbildung durch Verunreinigungen ein, die ein mehrfaches Umkristallisieren des Harnstoffes erforderlich machen. Außerdem verläuft die Reaktion des Hämiglobins mit Cyanid in Harnstofflösung sehr langsam[13]. Die Störung, die die Stromata verursachen, besteht in einer Erhöhung ihrer Lichtdurchlässigkeit nach Zusatz von Cyanid oder Dithionit. Dadurch wird die Abnahme der Extinktion im roten Gebiet bei der Überführung von Hämiglobin in Hämiglobincyanid oder Kohlenoxydhämoglobin verstärkt. In der Tabelle 5 sind Versuche wiedergegeben, die zeigen, daß Blutlösungen nach Überführung des darin enthaltenen Hämiglobins in Kohlenoxydhämoglobin (Reduktion der kohlenoxydhaltigen Lösung mit Dithionit) durch Zusatz von Cyanid noch eine weitere Aufhellung im roten Gebiet erfuhren. Ferner konnte in der Lösung des gleichen Blutes, dessen Hämiglobin an Cyanid gebunden war, durch Reduktion mit Dithionit noch eine weitere Aufhellung erzielt werden. Wurden aus der gleichen Blutlösung die Stromata durch Zentrifugieren entfernt, so waren zunächst die mit der Cyanidmethode wie der Kohlenoxydmethode gefundenen Hämiglobinkonzentrationen niedriger, und trat ferner nach Überführung des Hämiglobins in Kohlenoxydhämoglobin

[17] Havemann, R.: Angew. Chem. **54**, 105 (1941).

Tabelle 5. *Störung der Hämiglobinbestimmung durch die Stromata der roten Zellen.* 2,0 ccm Katzenblut auf 100 ccm Lösung, mit Kohlenoxyd gesättigt.

Vorbehandlung	Abnahme der Extinktion im roten Gebiet in Teilstrichen des Photometers	
	Zusatz von Cyanid	Zusatz von Dithionit
Nicht zentrifugiert	7	—
Nicht zentrifugiert	—	7
Nicht zentrifugiert + Dithionit	2	—
Nicht zentrifugiert + Cyanid	—	2
Zentrifugiert	5	—
Zentrifugiert	—	5
Zentrifugiert + Dithionit	0	—
Zentrifugiert + Cyanid	—	0

oder Hämiglobincyanid durch weiteren Zusatz von Cyanid bzw. Dithionit keine zusätzliche Aufhellung ein. Um den Einfluß der Stromata zu zeigen, wurden konzentriertere Blutlösungen als für die Hämiglobinbestimmungen verwandt, nämlich 2,0 ccm Blut auf 100 ccm Lösung.

Tabelle 6. *Hämiglobingehalt des Blutes gesunder Menschen nach verschiedenen Methoden bestimmt.*

Die Bezeichnung der Methode erfolgte nach der für die Messung wesentlichen Reaktion des Hämiglobins, nämlich Überführung in Kohlenoxydhämoglobin, in Hämiglobincyanid und Hämiglobincyanat. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf g Hämiglobin in 100 ccm Blut.

Nr.	Methode		
	Kohlenoxyd grün	Cyanid	Cyanat
1	0,17	0,30	0
2	0,13	0,30	0
3	0,06	0	0,17
4	—	0,13	0,11
5	0,06	0,13	0,17
6	0,12	0,10	0,11
7	0,11	0,06	0,44
8	0,08	0,10	0,22
9	0,07	0,03	0,22
10	0,06	0,06	0,22
11	0,05	0,10	0,22
12	—	0,10	0,33
13	0,08	0,06	0,06
14	0,08	0,06	0,11
Mittel	0,09	0,11	0,17

4. Ergebnisse.

Wir haben nicht in jedem Blut die Hämiglobinkonzentration mit allen Methoden bestimmt, vielmehr wurden an den Blutproben von Menschen die grüne Kohlenoxydmethode, die Cyanid-, Azid- und Cyanatmethode angewandt, in dem Blute der verschiedenen Versuchstiere jedoch das Hämiglobin mit den beiden Kohlenoxydmethoden und der Cyanidmethode bestimmt.

Die Ergebnisse der einzelnen Messungen sind in Tabelle 6 und 7 zusammengestellt. Die mit der Azidmethode erhaltenen Werte haben wir im einzelnen nicht aufgeführt. Bei den 14 Messungen am Menschenblut wurde 6mal eine Hämiglobinkonzentration von 0,06% und 8mal kein Hämiglobin gefunden. Wegen der geringen Empfindlichkeit der Methode ist diesen Ergebnissen kaum eine Bedeutung zuzuschreiben. Das gleiche gilt für die Messungen

mit der Cyanatmethode, deren Empfindlichkeit noch geringer ist. Erwartungsgemäß ist die Streuung der Meßwerte dieser Methode größer als bei den empfindlicheren Methoden. Immerhin ist der Mittelwert noch mit dem der anderen Methoden vergleichbar. Die mit den Kohlenoxydmethoden und der Cyanidmethode ermittelten Hämiglobinkonzentrationen weisen im Mittel nur eine geringe Abweichung auf. In Anbetracht der geringen Hämiglobinkonzentrationen neben der 100fachen Hämoglobinkonzentration darf man die Übereinstimmung wohl gar sehr gut nennen und als sicher beweisend für die Richtigkeit der Größe des Hämiglobingehaltes normalen Blutes ansehen. Die grüne Kohlenoxydmethode ergab die niedrigsten Konzentrationen, die rote Kohlenoxydmethode und die Cyanidmethode ein wenig höhere. Diese systematischen Abweichungen sind vermutlich Nebenreaktionen zuzuschreiben, aber noch nicht näher zu charakterisieren.

Tabelle 7. *Hämiglobingehalt des Blutes verschiedener Tiere nach verschiedenen Methoden bestimmt.* Der Gehalt ist angegeben in g Hämiglobin in 100 ccm Blut.

Tierart	Methode		
	Kohlenoxyd grün	Kohlenoxyd rot	Cyanid
Hund	0,13	0,10	0,13
	0,10	0,12	0,15
	0,09	0,18	0,16
	0,08	0,14	0,12
	0,15	0,15	0,18
	0,15	0,10	0,20
Mittel:	0,12	0,13	0,16
Katze	0,15	0,17	0,10
	0,10	0,08	0,10
	0,18	0,16	0,22
	0,15	0,15	0,12
	0,06	0,10	0,12
	0,09	0,12	0,22
	0,13	0,16	0,12
Mittel:	0,12	0,13	0,14
Ratte	0,03	0,10	0,10
	0,10	0,12	0,12
	0,06	0,14	0,10
	0,12	0,08	0,18
	0,06	0,10	0,14
Mittel:	0,07	0,11	0,13
Kaninchen	0	0,03	0,03
	0	0,05	0,08
	0	0,03	0,03
	0,02	0,03	0,06
	0	0	0
Mittel:	0	0,03	0,04
Meerschweinchen	0,03	0,06	0,08
	0	0,05	0,10
	0	0,02	0,02
	0,02	0	0
	0	0	0,05
Mittel:	0,01	0,03	0,05

Die im Kaninchen- und Meerschweinchenblut gemessenen Hämiglobinkonzentrationen liegen an der Grenze der Empfindlichkeit der Meßverfahren. Beachtenswert erscheint, daß mit der grünen Kohlenoxydmethode kein Hämiglobin nachweisbar war, während die rote Kohlenoxydmethode und die Cyanidmethode Konzentrationen anzeigen, die der Differenz zwischen den Ergebnissen der Bestimmungen am Blut

anderer Tierarten entspricht. Vielleicht liegen hier ausschließlich Nebenreaktionen vor.

Die Ergebnisse der Gesamthämoglobinbestimmungen haben wir nicht aufgeführt. Der Hämoglobingehalt der gesunden Individuen betrug bei den Menschen 14—15, Hunden 14—16, Katzen 11—13, Kaninchen und Meerschweinchen 12—13 g Hämoglobin/100 ccm Blut. Beziehungen des Hämiglobingehaltes zum Hämoglobingehalt waren nicht nachzuweisen.

Zusammenfassung.

Im Blute gesunder Menschen und Tiere wurde der Hämiglobingehalt mit verschiedenen photometrischen Methoden bestimmt. Diese Methoden beruhen auf der Überführung des Hämiglobins in Kohlenoxydhämoglobin, Hämiglobincyanid, Hämiglobinazid und Hämiglobincyanat. Am genauesten sind die Verfahren mit Kohlenoxyd und mit Cyanid. Unter Vermeidung von Fehlern, die bei früheren Messungen des normalen Hämiglobingehaltes nicht beachtet worden waren, wurden mit diesen Verfahren folgende mittleren Hämiglobinkonzentrationen gefunden: Mensch 0,10, Hund 0,13, Katze 0,13, Ratte 0,10, Meerschweinchen 0,03, Kaninchen 0,02 g Hämiglobin/100 ccm Blut. Die für das Meerschweinchen und Kaninchen genannten Konzentrationen lagen an der Grenze der Empfindlichkeit der Verfahren und sind als unsicher zu bezeichnen. Bei den anderen Tieren machte das Hämiglobin etwa 1% des Gesamthämoglobins aus.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Greifswald.

Über den Einfluß der Sulfhydrilgruppe auf die Cholinesterase*.

(Ein Beitrag zur Theorie der medizinischen Lichtwirkungen.)

Von

P. Wels und K. Repke.

(Eingegangen am 9. Oktober 1944.)

Die Untersuchungen, die wir im folgenden beschreiben wollen, gingen von einer Frage aus, die sich aus früheren Arbeiten des Instituts[1] über die Wirkungsweise des Lichtes ergab. Diese Arbeiten hatten erwiesen, daß die Reduktionswirkung, welche die in der Keimschicht der Haut fixierten Sulfhydrilgruppen ausüben, durch das Licht verstärkt wird. Das wurde an Stoffen gezeigt, die sich bei der Reduktion verfärben (Natriumtellurit, Dehydroindigo, Nitroanthrachinon). Durchströmt man ein Schweineohr von der Arterie aus mit der Lösung eines solchen Stoffes und belichtet es dabei durch eine Schablone mit der Quarzlampe, so tritt an den vor dem Licht geschützten Hautstellen nur eine geringe Verfärbung ein, während im Bereich der Schablonenöffnung, durch welche das volle Licht auf die Haut fällt, diese sehr viel stärker verfärbt wird, so daß sich nach der Bestrahlung die Schablonenfigur scharf von ihrer Umgebung abhebt. Vergiftet man die Sulfhydrilgruppen der Haut durch eine Vordurchströmung mit Monojodacetat, so bleiben diese Erscheinungen aus.

Das Licht beschleunigt also einen Redoxvorgang, bei welchem die genannten Stoffe zu gefärbten Körpern reduziert und die Sulfhydrilgruppen der Haut oxydiert werden. Es ist wichtig, diese Zweiseitigkeit der Lichtwirkung zu beachten. Bisher war das Augenmerk zu einseitig auf die Oxydationen gerichtet. Das hängt wohl vorwiegend damit zusammen, daß einerseits die augenfälligste Lichtwirkung an der Haut die Bräunung ist und andererseits bekannt ist, daß das Hautpigment, das die Bräunung erzeugt, aus seinen farblosen Vorstufen durch Oxydation entsteht.

Die Frage nach der physiologischen Bedeutung der Redoxvorgänge in der belichteten Haut führt auf diejenigen körpereigenen Stoffe, die aus ihren Oxydationsstufen reversibel reduzierbar sind und deshalb nach ihrer Reduktion selbst reduzierend wirken. Solche reversiblen Redoxsysteme kommen im Blut und den Gewebssäften bekanntlich in erheblicher Anzahl vor (Übersicht bei Kühnau[2]). Zu ihnen gehört das Glutathion und die

* Herrn Geheimrat Straub-München zum 70. Geburtstag gewidmet.

[1] Ortmann, P.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **191**, 12 (1939); **192**, 96 (1939). — [2] Kühnau, J.: Ther. Gegenw. **82**, 335, 374 (1941).

Ascorbinsäure. Wenn sie mit dem Blut- und Lymphstrom den fixen Sulfhydrilgruppen der Haut zugeführt werden und nach der Reduktion wieder in den Kreislauf und damit in das Körperinnere abfließen, so müssen sie dort den Gehalt des Blutes und der Gewebe an reduzierenden Stoffen vermehren; sie verschieben das Redoxgleichgewicht des Körperinneren nach der Reduktionsseite. Solche Verschiebungen aber sind mitbestimmend für den Ablauf der Stoffwechselvorgänge, da sie die Wirksamkeit der Fermente, Hormone und Vitamine beeinflussen, welche den Stoffwechsel beherrschen.

Diese Vorstellung von der Lichtwirkung auf das Körperinnere ist zwar einstweilen hypothetisch, doch ist sie der experimentellen Prüfung zugänglich und ergibt deshalb einen Arbeitsplan. In diesem Plan ist die Cholinesterase nicht das Nächstliegende. Wahrscheinlich wäre es ergiebiger, die Reduktionswirkung an den eiweißspaltenden Fermenten oder den Sexualhormonen zu untersuchen, doch war dieses aus kriegsbedingten Gründen nicht möglich. Für die Untersuchung der Cholinesterase war dagegen die Apparatur vorhanden und das Material leicht beschaffbar. Wir wollen also, im besonderen Hinblick auf die Stoffwechselwirkungen des Lichtes, die Frage beantworten, wie die Cholinesterase durch Reduktionsmittel beeinflußt wird und wählen als Reduktionsmittel wieder die Sulfhydrilgruppe.

Während die intrazellulären Proteasen Papain und Kathepsin, welche selbst Sulfhydril-Disulfidsysteme darstellen, durch Sulfhydrilkörper aktiviert werden (Grassmann[3,4], Waldschmidt-Leitz[5]), sprechen einige Versuche dafür, daß bei den fett- bzw. esterspaltenden Enzymen eine Inaktivierung stattfindet (Waldschmidt-Leitz[6,7], Schäffner und Bauer[8]). Allerdings sind diese Befunde noch nicht genügend gesichert (Lohmann[9]), und im Besonderen sind die Verhältnisse bei der Cholinesterase noch ganz unklar, da die Ergebnisse der Untersuchungen sich widersprechen (Keeser[10], Ammon[11]). Eine ausführliche Studie über diesen Gegenstand liegt von Nachmansohn und Lederer[12] vor. Die Autoren finden eine Hemmung der Cholinesterase durch SS-Glutathion und durch eine Reihe von Sulfhydrilgiften (Monojodessigsäure, Aloxan, Maleinsäure, Kupfer). Sie kommen zu dem Schluß, daß die Cholinesterase in ähnlicher Weise wie das Papain und das Kathepsin eine Sulfhydrilgruppe trage, die für die

[3] Grassmann, W., H. Dyckerhoff u. O. v. Schoenebeck: Hoppe-Seylers Z. **186**, 183 (1930). — [4] Grassmann, W., O. v. Schoeneb eck u. H. Eibeler: Hoppe-Seylers Z. **194**, 124 (1931). — [5] Waldschmidt-Leitz, E., L. Weil u. A. Purr: Hoppe-Seylers Z. **215**, 64 (1933). — [6] Waldschmidt-Leitz, E.: Naturwiss. **20**, 122 (1932). — [7] Waldschmidt-Leltz, E., A. Scharikowa u. A. Schäffner: Hoppe-Seylers Z. 224, 75 (1933). — [8] Schäffner, A. u. E. Bauer: Hoppe-Seylers Z. **225**, 245 (1934). — [9] Lohmann, K.: Biochem. Z. **262**, 157 (1933). — [10] Keeser, E: Klin. Wschr. **1938 II**, 1811. — [11] Ammon, R.: Erg. Enzymforsch. **9**, 35 (1943). — [12] Nachmansohn, D. u. E. Lederer: Bull. Soc. Chim. biol. (Fr.) **21**, 797 (1939).

Wirksamkeit des Fermentes entscheidend sei. An diese Untersuchungen knüpft unsere Arbeit an.

Methodik.

Wir verwandten für unsere Versuche Katzenserum und maßen die Acetylcholinspaltung durch das Serum mit der Barcroft-Apparatur (Warburgsche Modifikation) nach der von R. Ammon[13] angegebenen Methode, bei welcher die aus Acetylcholin freiwerdende Essigsäure aus Bicarbonat Kohlensäure austreibt, deren Volumen manometrisch bestimmt wird. Das Katzenserum war bei Aufbewahrung im Eisschrank (+ 2° C) eine Woche lang für die Versuche verwendbar.

In kegelförmigen Warburg-Gefäßen von durchschnittlich 20 ccm Inhalt brachten wir in den Hauptraum 1,5 ccm 0,5%ige Acetylcholinlösung in Krebsringer[14], in den sackförmigen Anhang 0,5 ccm Serum, das zu gleichen Teilen mit Lösungen der zu prüfenden Stoffe versetzt worden war. Alle Konzentrationsangaben über diese Stoffe beziehen sich auf den Anhangsinhalt vor dessen Einkippen in den Hauptraum. Wir prüften vor allem das Monojodacetat und das Cystein. Das Monojodacetat stellten wir durch Auflösen von kristallisierter Monojod-Essigsäure in äquivalenten Mengen von Natronlauge her und bereiteten es vor jedem Versuch frisch, wodurch das Auftreten freien Jods weitgehend vermieden wird. Das Cysteinhydrochlorid neutralisierten wir ebenfalls mit Natronlauge. Die dabei entstehende Kochsalzkonzentration ist verhältnismäßig hoch, so daß beim Einkippen des Anhangsinhaltes in den Hauptraum des Gefäßes die dort befindliche Krebsringerlösung in ihrer Zusammensetzung erheblich verändert wird. Die cysteinfreien Kontrollansätze müssen daher den gleichen Kochsalzzusatz erhalten. In den Versuchen mit Monojodacetat enthielten die Kontrollansätze anstelle der Jodacetatlösung nur Wasser. — Einige Versuche wurden auch mit Cystin angesetzt, das wir in einer Serumverdünnung 1:1 mit Wasser bis zur völligen Sättigung (Bodenkörper) auflösten.

Bei der Neutralisation wurde stets darauf geachtet, daß die fertigen Serumansätze das p_H der Krebsringerlösung (7,4) hatten. Auch alle Kontrollansätze wurden durch Zugabe verdünnter Natronlauge auf dieses p_H gebracht. Wir begnügten uns dabei mit Vergleichsbestimmungen durch Merckscheses Indikatorpapier. Von der Verwendung besonderer Puffer im Inhalt der Gefäßanhänge sahen wir ab. Wir verschafften uns aber in jedem Versuch durch besondere Kontrollansätze die Sicherheit, daß die gemessene Kohlensäure aus dem Bicarbonat der Ringer-Lösung nur durch die aus dem Acetylcholin entstehende Essigsäure ausgetrieben worden war und daß nicht etwa durch p_H-Abweichungen des Anhangsinhaltes Kohlensäure entstehen oder verschwinden konnte. In diesen Kontrollansätzen war im Hauptraum das Acetylcholin fortgelassen. Die erhaltenen Manometerausschläge lagen hier aber stets innerhalb der Fehlergrenzen der Methode (5—10% des Gesamtausschlages der Hauptansätze).

Die Einwirkungszeit der zu prüfenden Stoffe auf das Katzenserum betrug im Durchschnitt $1^1/_2$ Stunden bei Zimmertemperatur. In einigen Versuchen wandten wir eine längere Einwirkungszeit (bis zu 24 Stunden) oder eine höhere Temperatur (37,5° C) an.

Den Gasraum der Manometer und Gefäße füllten wir mit einem Gemisch von 95% Stickstoff und 5% Kohlensäure, das wir in einem Gasometer herstellten. Da der käufliche Stickstoff stets Sauerstoff enthält und dieser in den Cysteinversuchen wegen der Autoxydation des Cysteins zu Fehlern (Druckverminderungen) führt, reinigten wir den Stickstoff vor der Herstellung des Gasgemisches durch Überleiten über Kupferspäne bei 500° C (Apparatur bei Michaelis und Rona[15]). Da sich bei

[13] Ammon, R.: Pflügers Arch. **233**. 486 (1934). — [14] Krebs, H. A. u. R. Henseleit: Hoppe-Seylers Z. **210**, 33 (1932). — [15] Michaelis, L. u. P. Rona: Praktikum der physikalischen Chemie, 4. Aufl., S. 210. Berlin 1930.

der Herstellung des Gasgemisches und bei der Gasfüllung der Gefäße trotzdem ein geringer Zutritt von Luftsauerstoff nicht völlig ausschließen ließ, führten wir in allen Cysteinversuchen noch besondere Kontrollbestimmungen ohne Acetylcholin durch, in denen die durch die Cysteinoxydation hervorgerufene Druckverminderung bestimmt und bei den Hauptansätzen in Rechnung gestellt werden konnte. Bei höheren Cysteinkonzentrationen ($^1/_2$ molar) waren die Manometerausschläge dieser Kontrollansätze nicht unbeträchtlich. Sie betrugen bis zu 50% des Ausschlages des Hauptansatzes. Bei Verwendung ungereinigten Stickstoffes oder bei Ersatz des Stickstoffes durch Sauerstoff wurden die auf die Autoxydation des Cysteins zu beziehenden Druckverminderungen so groß, daß der Versuch unbrauchbar wurde.

Die Temperatur des Wasserbades, in dem die Gefäße geschüttelt wurden, betrug 37,5°, die Schüttelgeschwindigkeit 100 Perioden in der Minute, die Versuchsdauer 60 Min. In dieser Zeit wurden Manometerausschläge zwischen 100 und 200 mm erhalten.

Wir nahmen sowohl in den Hauptansätzen wie in den Kontrollansätzen stets Doppelbestimmungen vor, doch hatten wir nie mehr als 12 Manometer zugleich im Versuch.

Versuchsergebnisse.

I. Monojodessigsäure.

Wir werden weiter unten noch darlegen, aus welchen Gründen wir im Zusammenhange mit den Lichtwirkungen die Frage prüfen wollten, ob die Cholinesterase durch reduzierende Stoffe und insbesondere durch die SH-Gruppe inaktiviert wird. Wenn die Feststellung von Nachmansohn und Lederer[12] richtig wäre, daß Sulfhydrilgifte das Ferment hemmen, so wäre die Frage von vornherein entschieden, denn dann wäre die Cholinesterase wie das Kathepsin und das Papain ein Sulfhydril-Disulfidsystem, bei dem gerade die reduzierte Form, die Sulfhydrilform, die aktive ist. Wir haben unter den von Nachmansohn und Lederer geprüften Stoffen nur das Monojodacetat untersucht. Dieses bindet zwar die Sulfhydrilgruppe nicht unter allen physiologisch vorkommenden Verhältnissen mit gleicher Sicherheit, doch ist es das bekannteste Sulfhydrilgift und gibt daher einen ersten Anhalt für die Beantwortung der Frage, ob der von den genannten Autoren an einer Cholinesterase aus Kaltblütergewebe (elektrisches Organ von Torpedo vulgaris) erhobene Befund sich auf das Ferment des Katzenserums übertragen läßt. Das scheint nicht der Fall zu sein. In unseren Versuchen wurde die Aktivität des Fermentes durch Monojodacetat bis zur Konzentration $^1/_4$ molar und einer Einwirkungsdauer von $1^1/_2$ Stunden überhaupt nicht meßbar verändert. Bei der Konzentration $^1/_2$ molar fand eine gewisse Fermenthemmung statt, doch lag sie bei der angegebenen Einwirkungszeit noch nicht sicher außerhalb der Fehlerbreite der Methode. Sie betrug nur 12%. Eine gleich unsichere Hemmung erhielten wir bei der Konzentration $^1/_{10}$ molar und einer Einwirkungszeit von $6^1/_2$ Stunden. Nachmansohn und Lederer aber finden bei dieser Konzentration und Einwirkungszeit bereits eine 100%ige Hemmung ihres Fermentes.

Erst als wir in nachträglichen Versuchen die Konzentration $^1/_2$ molar 6 Stunden lang einwirken ließen, erhielten wir eine 30%ige Hemmung des Fermentes. Zugleich zeigte das mit Monojodacetat versetzte Serum dabei eine Säuerung, über deren Ursache wir uns nicht klar wurden. Das p_H sank vom Ausgangswert 7,4 um eine Zehnerpotenz und entfernte sich damit erheblich vom Wirkungsoptimum der Cholinesterase, das bei p_H 8 angenommen wird (Ammon[16]). Allerdings läßt sich die Fermenthemmung durch diese Säuerung nur zum kleinen Teil erklären, denn in Kontrollansätzen, in denen die gleiche Säuerung durch Zusatz von Salzsäure herbeigeführt war, fiel die Fermentaktivität nur wenig ab. Vielleicht wurde aus dem Monojodacetat schon während der 6stündigen Einwirkung freies Jod abgespalten und die Fermenthemmung durch dieses hervorgerufen. Jedenfalls kann, wenn für die verhältnismäßig geringe Hemmung von 30% eine so hohe Konzentration und eine so lange Einwirkungszeit notwendig ist, nicht mehr von einer spezifischen Hemmung der Cholinesterase durch das Sulfhydrilgift Monojodacetat gesprochen werden.

Die Tabelle 1 zeigt einige der von uns erhaltenen Ergebnisse.

Tabelle 1.

Vers.-Nr.	Einwirkungszeit des Giftes Min.	Ansatz (M = Monojodacetat)	cmm CO_2 in 1 Std.	Beeinflussung der Fermentaktivität
10	142	ohne M	337	3% Förderung
		0,1 m M	348	
69	80	ohne M	263	4% Hemmung
		0,25 m M	252	
68	75	ohne M	256	12% Hemmung
		0,5 m M	224	
90	390	ohne M	214	11% Hemmung
		0,1 m M	190	

Die am Kaltblüterferment gewonnene Vorstellung, daß die aktive Esterase ein SH-Körper sei, trifft also auf das Warmblüterferment offenbar nicht zu. Der aus dieser Vorstellung abzuleitende Schluß, daß das Ferment durch Reduktionsmittel aktiviert und durch Oxydationsmittel inaktiviert werde, ist dann für das Warmblüterferment ebenfalls nicht richtig. Es bleibt vielmehr für die Annahme Raum, daß es auch umgekehrt sein könnte. Wir prüften deshalb die Wirkung des Cysteins.

II. Cystein.

Die Tabelle 2 zeigt einige Versuchsbeispiele.

Im ganzen wurden 28 solcher Versuche mit verschiedenen kleineren Abänderungen der Anordnung angestellt. Sie hatten alle das gleiche Ergebnis: Das Cystein hemmt die Cholinesterase.

[16] Ammon, R.: Methoden der Fermentforschung. Bd. 2, S. 1587. Leipzig 1941.

Eine längere Einwirkungsdauer des Cysteins auf das Katzenserum im Gefäßanhang vor dem Einkippen in den Hauptraum führte, auch bei Ausdehnung bis zu 23 Stunden, zu keiner Vergrößerung der Hemmung mehr. Die Oxydation des Cysteins verhinderten wir in diesen langfristigen Versuchen dadurch, daß wir das mit Cystein versetzte Serum mit reinem Stickstoff sättigten und unter Stickstoffatmosphäre im geschlossenen Gefäß aufbewahrten. Die in dem dann angesetzten Versuch gemessene Hemmung war nicht größer als bei einem nach Ablauf der 23 Stunden frisch bereiteten Vergleichsansatz, in dem das Cystein nur 60 Min. lang auf das Serum einwirkte.

Tabelle 2. *Einwirkungszeit des Cysteins auf das Serum überall 80—90 Min.*

Vers.-Nr.	Ansatz	cmm CO_2 in 1 Std.	Fermenthemmung %
60	ohne Cystein	248	—
	0,11 m Cystein	191	23
	0,22 m Cystein	154	38
61	ohne Cystein	255	—
	0,11 m Cystein	219	16
	0,22 m Cystein	173	32
87	ohne Cystein	313	—
	0,11 m Cystein	253	19
	0,44 m Cystein	158	49
88	ohne Cystein	301	—
	0,11 m Cystein	242	20
	0,44 m Cystein	156	48
93	ohne Cystein	227	—
	0,22 m Cystein	151	33
	0,44 m Cystein	99	56

Wir haben schon im Abschnitt Methodik erwähnt, daß die Oxydation des Cysteins sehr wohl beachtet werden muß, wenn sich dieses im Manometergefäß unter dem Gemisch von 95% Stickstoff und 5% Kohlensäure befindet, denn auch bei Verwendung reinen Stickstoffs besteht bei der Mischung der Gase trotz aller Vorsicht die Möglichkeit des Zutritts von Luftsauerstoff. Es ist auch nicht immer sicher, daß die käufliche Kohlensäure frei von Sauerstoff ist. Jedenfalls zeigen die sehr erheblichen Druckverminderungen in den Kontrollansätzen, daß unter unseren Versuchsbedingungen stets ein wenn auch nicht sehr großer Prozentsatz des Cysteins während des Versuches oxydiert wird. Es ergibt sich deshalb die Frage, ob nicht das entstehende Cystin das Ergebnis beeinflußt.

III. Cystin.

Diese Frage ist um so wichtiger, als Nachmansohn und Lederer bei ihren Versuchen an der Kaltblüteresterase fanden, daß das oxydierte Glutathion, das ja wie das Cystin ein Disulfid ist, eine deutliche Hemmungswirkung hat. Ein Zusatz von 1 ccm m/30 SS-Glutathion auf 2 ccm Fermentlösung rief eine Hemmung von 24% hervor. Die molare Konzentration an Cystin ist in unseren Versuchen um wenigstens eine Zehnerpotenz niedriger, denn selbst wenn bei der Cysteinoxydation eine gesättigte Cystinlösung entsteht, so ist deren Konzentration weniger als $^1/_{1000}$ molar.

Immerhin geben Riechert und Schmidt[17] an, daß eine solche Lösung (500 γ Cystin auf 2 ccm) an einer Cholinesterase aus Blutegelextrakten eine 15%ige Hemmung hervorruft. Diese Angaben führen wieder zu der am Anfang erörterten Frage zurück, ob nicht doch die Cholinesterase durch Reduktion aktiviert und durch Oxydation inaktiviert wird, denn SS-Glutathion und Cystin sind Oxydationsmittel. Es wäre dann möglich, daß die von uns durch Cystein erhaltene Hemmung nicht auf das Cystein und dessen Reduktionswirkung, sondern auf das aus dem Cystein entstandene Cystin und dessen Oxydationswirkung zu beziehen wäre. Dem steht allerdings entgegen, daß bei unserer Anordnung noch am Ende des Versuches die Reduktionswirkung des Cysteins weit überwiegen muß. Die bei jedem Versuch zum Schluß mit dem Gefäßinhalt angestellte Nitroprussidnatriumreaktion war immer stark positiv, nicht merklich geringer als am Anfang. Aus den im Abschnitt „Methodik" erwähnten Parallelansätzen, in welchen die Oxydation des Cysteins kontrolliert wurde, läßt sich ferner aus der Druckverminderung der Sauerstoffverzehr und damit die Menge des oxydierten Cysteins errechnen. Sie beträgt im Höchstfalle 5% der zugesetzten Menge. Die hieraus entstehende Cystinmenge liefert aber in dem Gefäßinhalt eine gesättigte Cystinlösung. Eine besondere Prüfung der Cystinwirkung auf die Cholinesterase unseres Katzenserums war daher angezeigt.

Tabelle 3.

Vers.-Nr.	Ansatz	cmm CO_2 in 1 Std.	Fermenthemmung %
32	ohne Cystin	216	6
	gesättigte Cystinlösung	203	
33	ohne Cystin	200	
	gesättigte Cystinlösung	195	2
95	ohne Cystin	220	
	gesättigte Cystinlösung	214	3

Die Tabelle 3 zeigt das Ergebnis, das mit gesättigten Cystinlösungen erhalten wurde. Man sieht, daß das Cystin keinen meßbaren Einfluß auf die Cholinesterase des Katzenserums hat.

Immerhin sind die Versuche wegen der Schwerlöslichkeit des Cystins nicht befriedigend. Es ist notwendig, reversible Redoxsysteme zu untersuchen, deren Oxydationsformen gut wasserlöslich sind, z. B. das System SH-Glutathion — SS-Glutathion oder das System Ascorbinsäure — Dehydroascorbinsäure. Wenn bei diesen die Oxydationsformen eine hemmende Wirkung auf die Cholinesterase haben, so kann auch die umgekehrte Frage aufgeworfen werden, ob sie in dem Versuchsmilieu nicht reduziert werden und erst die Reduktionsform die Wirkung ausübt. Es kann auch gefragt werden, ob nicht das ganze System als Reduktions-

[17] Riechert, W. u. E. Schmidt: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **199**, 66 (1942).

oder Oxydationskatalysator wirkt und dabei zwischen Reduktions- und Oxydationsform hin und her pendelt.

Aus den bisher beschriebenen Versuchen ergibt sich einstweilen als eindeutiges Resultat, daß das Cystein von der Konzentration 0,1 molar an aufwärts eine Aktivitätshemmung der Cholinesterase bewirkt, die mit zunehmender Konzentration des Cysteins zunimmt. Die verhältnismäßig hohe Konzentration, die zur Hemmung erforderlich ist, zeigt, daß die Hemmung durch Cystein anderer Art sein muß als die Hemmung durch das spezifische Cholinesterasegift Eserin. Wir haben, bevor wir die Cysteinversuche begannen, eine Reihe von Vorversuchen mit Eserin angestellt und fanden eine etwa 50%ige Hemmung bei der Eserinkonzentration 1:2 Millionen molar. Beim Eserin handelt es sich offenbar um eine spezifische Bindung der die Aktivität bestimmenden Atomgruppe im Ferment, beim Cystein vielleicht nur um einen Milieufaktor, der durch das Reduktionsvermögen des Stoffes definiert ist.

In Ergänzung zu diesen Versuchen haben wir später noch einen Versuch mit Menschenserum angestellt. Wir erhielten mit m/4 Cystein eine 28%ige Hemmung, mit m/8 Cystein eine 15%ige Hemmung der Cholinesterase. Das Ergebnis läge also in gleicher Richtung wie beim Katzenserum.

IV. Bestrahlung.

In der Einleitung waren wir von der Vorstellung ausgegangen, daß die belichtete Haut reduzierende Stoffe in das Körperinnere sendet, welche dort auf die Fermentaktivität einwirken. Man könnte aber die Frage erörtern, ob solche Zwischenträger zwischen Haut und Ferment notwendig sind und ob nicht das Ferment selbst unmittelbar an den fixen Sulfhydrilgruppen der Haut reduziert werden könnte. Diese Vorstellung hatten wir in früheren Arbeiten[18] bevorzugt. Aus ihr ergibt sich die Frage, ob dann nicht die Reaktion zwischen Sulfhydrilgruppen und Ferment durch das Licht beschleunigt wird, ähnlich wie die Reduktion des Tellurits oder des Dehydroindigos in den Modellversuchen am Schweineohr beschleunigt wird. Wir stellten in dieser Richtung einige Versuche an und bestrahlten das cysteinhaltige Serum mit der Quarzlampe[19]. In Vorversuchen ergab sich, daß hierzu die ungefilterte Strahlung nicht benutzbar war, da sie die Cholinesterase in wenigen Minuten zerstört. Filterten wir das Licht durch ein 3 mm dickes Schottfilter BG 19*, welches das kurzwellige Ultraviolett abschneidet und nur das langwellige Ultraviolett und das sichtbare Licht übrigläßt, so war der zerstörende Einfluß verschwunden. Mit dieser Strahlung stellten wir die Versuche an. Das cysteinhaltige Serum war dabei

[18] Zusammenfassung bei P. Wels: Strahlenther. **75**, 188 (1944). — [19] Methodik bei P. Wels: Pflügers Arch. **223**, 395 (1930).

* Schott u. Gen.: Jenaer Farb- und Filterglas für Wissenschaft und Technik. Liste 7358.

mit reinem Stickstoff gesättigt und befand sich in geschlossenen, mit Stickstoff gefüllten Quarzröhren, wodurch die Oxydation des Cysteins verhindert wurde und die günstigsten Bedingungen für Reduktionsvorgänge hergestellt waren. Es ergab sich, daß selbst eine 2stündige Bestrahlung auf die hemmende Wirkung des Cysteins keinen Einfluß hat. Wir benutzten die Cysteinkonzentration 0,1 molar, also die geringste Konzentration, bei der noch ein sicherer Hemmungseffekt auftrat. Steigerungen des Hemmungseffektes hätten sich bei dieser Anordnung besonders deutlich zeigen müssen. Der Hemmungseffekt war aber bei den bestrahlten und unbestrahlten Portionen der gleiche. Er betrug wieder etwa 15%. Eine Beschleunigung der Reaktion zwischen der Cholinesterase des Serums und dem zugesetzten Cystein wäre ja allerdings auch nur dann zu erwarten, wenn diese Reaktion mit einer gewissen Langsamkeit verliefe und in dieser Hinsicht den Modellreaktionen mit Tellurit, Dehydroindigo und Nitroanthrachinon ähnlich wäre. Das ist aber wohl nicht der Fall, was schon die obenerwähnten Versuche mit verschiedenen Einwirkungszeiten zeigen, bei denen sich zwischen einer $1^1/_2$stündigen und einer 23stündigen Einwirkung kein Unterschied in der Hemmung ergab. Wahrscheinlich ist die Reaktion in noch wesentlich kürzerer Zeit als $1^1/_2$ Stunden schon beendet. Bei der Vorbereitung eines Serienansatzes sind aber wesentlich kürzere Zeiten schwer einzuhalten, da die Einzelhantierungen eine gewisse Mindestzeit erfordern. Vielleicht stellt sich die Fermentaktivität momentan auf das Redoxmilieu ein, ebenso wie sie sich momentan auf das p_H einstellt.

Bemerkungen zu den Versuchsergebnissen.

1.

Die am Eingang der Arbeit angeführten Modellversuche mit Farbstoffen bringen die einfache Erkenntnis in Erinnerung, daß die Oxydationsvorgänge im tierischen Organismus mit Reduktionsvorgängen gekoppelt sind und daß diese Regel auch für die Oxydationsvorgänge in der belichteten Haut gilt. Hierbei können Oxydation und Reduktion derart verteilt sein, daß sich die erstere an fixierten Hautbestandteilen abspielt, während die letztere sich an Stoffen vollzieht, die der Haut auf dem Blutwege zugeführt werden und sie auf diesem Wege auch wieder verlassen.

Die Folgerung, daß so von der belichteten Haut aus ständig neue Reduktionsvalenzen dem Körperinneren zufließen, greift in physiologische Vorstellungen von sehr allgemeinem Inhalt ein. Das Reduktionsvermögen ist eine Grundeigenschaft der lebenden Substanz und ein Ausdruck der in ihr vorhandenen Energiereserven. Die Energie, die im Wasserstoff der brennbaren Substrate angehäuft ist, wird nicht auf einmal, sondern stufenweise verausgabt, indem der Wasserstoff sich nicht sofort mit dem Sauerstoff zu Wasser vereinigt, sondern auf dem Wege zum Sauerstoff eine Reihe von Zwischenträgern durchläuft. Diese repräsentieren das Reduktionsvermögen des Gewebes. Ihr Verschwinden ist ein Zeichen der Verausgabung aller Energie und damit ein Zeichen des Todes. Aller Wasserstoff ist dann „in Händen von Sauerstoff" (Knoop[20]).

[20] Knoop, F.: Oxydationen im Tierkörper. Stuttgart 1931.

Es ist deshalb möglich, daß sich in der Bestimmung des Reduktionsvermögens ein brauchbarer Gradmesser der „Vitalität" wird gewinnen lassen. Noch sind die Methoden der Messung des Redoxpotentials im Blut und in den Geweben nicht so weit entwickelt, daß sie Werte von ausreichender Verläßlichkeit ergeben. Bestrebungen in dieser Richtung sind aber vorhanden und haben auch schon zu einigen Ergebnissen geführt. So fand L. Meyer[21] bei Schwerkranken und Moribunden ein starkes Absinken der negativen Potentialwerte im Blut und einen Anstieg bei Zufuhr von Vitamin C.

Die durch die Modellversuche nahegelegte Vorstellung, daß die „belebende" Wirkung des Lichtes aus einem Zufluß reduzierender Stoffe aus der bestrahlten Haut in das Körperinnere erklärt werden könnte, gewinnt an Wahrscheinlichkeit, wenn man sich vergegenwärtigt, daß die Haut ein sehr umfangreiches Organ ist, dessen Gesamtmasse die der Leber übertrifft, und daß ihre an sich schon große Oberfläche für die Lichtwirkungen noch dadurch vergrößert wird, daß die sulfhydrilhaltige Keimschicht durch die von unten hineinragenden Coriumpapillen vielfach gebuchtet ist. Der Zustrom an Reduktionsvalenzen aus diesem Organ kann daher schon ein sehr beträchtlicher sein. Die Aussicht, ihn summarisch zu erfassen, hängt von der Entwicklung der Meßmethoden für die Redoxgleichgewichte im Blut und in den Geweben ab. Es wäre von besonderem Interesse, den Zustrom aus der belichteten Haut mit demjenigen zu vergleichen, der aus dem Magen-Darmkanal kommt und durch die Nahrung unterhalten wird. Dieser ist sicher erheblichen Schwankungen unterworfen, die von der Zubereitung der Nahrung abhängen. Er ist bei der Rohkost am größten, denn je näher das Nährmaterial noch dem lebenden Tier- oder Pflanzenkörper steht, aus dem es stammt, desto besser ist in ihm das Kennzeichen des lebenden Gewebes, die Fähigkeit zu reduzieren, erhalten.

2.

Die Versuche, die wir an der Cholinesterase des Warmblüterserums anstellten, haben gezeigt, daß von der Reduktionswirkung der Sulfhydrilgruppe keinesfalls eine Förderung der Fermentaktivität zu erwarten ist und machen es unwahrscheinlich, daß das Ferment wie die Proteasen ein Disulfid-Sulfhydrilsystem darstellt, das nur in der reduzierten Form wirksam ist. Die Wirkungen höherer Cysteinkonzentrationen müssen eher so gedeutet werden, daß das Ferment durch Reduktion inaktiviert wird. Der Schluß, daß eine solche Inaktivierung auch durch die vermehrten Reduktionskräfte zustande kommen müsse, die nach unserer Vorstellung von der bestrahlten Haut aus im Körperinneren erzeugt werden, ist noch verfrüht. Die verhältnismäßig großen Cysteinkonzentrationen, die zur Hemmung der Cholinesterase erforderlich sind, mahnen zur Vorsicht in der Annahme, daß eine solche Hemmung auch durch die Reduktionskräfte auftreten könnte, die im Blut und den Geweben erreichbar sind. Hier sind weitere Versuche erforderlich, bei denen es zweckmäßig sein wird, zur Bestimmung der Fermentaktivität nicht allein die manometrische Methode anzuwenden und als Sulfhydrilkörper nicht allein das Cystein zu benutzen. Solche Versuche erscheinen lohnend, weil sie den Schlüssel zum Verständnis einer wichtigen Lichtwirkung liefern könnten. Die Erhöhung des Vagustonus, welche einer Aktivitätsverminderung der Cholinesterase folgen müßte, ist nämlich nach Bestrahlung wirklich vorhanden. Das haben in neuerer Zeit vor allem Lehmann und Szakáll[22] aus ihren gasanalytischen Stoffwechselversuchen erschlossen. Nach diesen Untersuchungen sinkt nach Ultraviolettbestrahlung des Menschen der Grundumsatz, während der respiratorische Quotient steigt. Der Kalorienverbrauch je Meterkilogramm geleisteter Arbeit nimmt ab. Die Sauerstoffschuld nach Leistung einer bestimmten Arbeit wird geringer. Es

[21] Meyer, L.: Biochem. Z. **303**, 32 (1939). — [22] Lehmann u. Szakáll: Arb.-physiol. **5**, 278 (1932); **6**, 84 (1932).

tritt also eine Zunahme der Leistungsfähigkeit ein wie beim Trainierten. Ferner steigt die Alkalireserve an. Alles das aber sind Erscheinungen, die darauf hindeuten, daß im vegetativen System das Gleichgewicht nach der Vagusseite verschoben ist. Auch die Herabsetzung des Blutzuckergehaltes nach Bestrahlungen, die schon seit langem bekannt ist und die man auch zu Heilzwecken auszunutzen versucht hat[23], kann als Vaguswirkung gedeutet werden.

Zwischen den Reduktionsvorgängen und dem Vagustonus besteht aber noch eine Beziehung anderer, allgemeinerer Art. Im Stoffwechsel bedeutet Reduktion Energiespeicherung, Oxydation Energieverausgabung. Die regenerativen, assimilatorischen Vorgänge sind mit Reduktionen verbunden, die dissimilatorischen mit Oxydationen. Die Reduktion entspricht der Erholungsphase, die Oxydation der Leistungsphase. Das vegetative System steuert diese Vorgänge, indem die reduktive Energiespeicherung einem erhöhten Vagustonus zugeordnet ist, die oxydative Energieverausgabung einem erhöhten Sympathicustonus. Wenn es nun richtig ist, daß die Cholinesterase durch Reduktion gehemmt wird, so muß die Vermehrung der Reduktionsvalenzen, die unter dem Einfluß eines erhöhten Vagustonus stattfindet, ihrerseits wieder den Vagustonus fördern, indem der Abbau des Acetylcholins verlangsamt wird. Der Vagustonus schafft sich also selbst die Voraussetzung für seinen Fortbestand. Eine Verknüpfung ähnlicher Art ist dann aber auch bei den Lichtwirkungen denkbar. Die Vermehrung der Reduktionsvalenzen im Körperinnern von der bestrahlten Haut aus hemmt die Cholinesterase und erhöht dadurch den Vagustonus, der nun seinerseits wieder die Reduktionsvalenzen vermehrt. In die reduktiven Lichtwirkungen schaltet sich also der Vagus als Verstärker ein. Natürlich muß zur Erhaltung des Gleichgewichtes diese Verstärkerwirkung irgendwie begrenzt sein. Vielleicht ist die Begrenzung durch das Insulin gegeben, dessen Wirksamkeit im Stoffwechsel mit den Vaguswirkungen gleichsinnig und mit ihnen untrennbar verknüpft ist (Gremels[24]), das durch Reduktion aber inaktiviert wird (Freudenberg und Wegmann[25]).

Der nach Bestrahlungen erhöhte Vagustonus könnte auch zur Erklärung der Blutdrucksenkung herangezogen werden, welche von jeher als verwertbare Nebenwirkung der Höhensonnenkuren hervorgehoben worden ist. Die von der bestrahlten Haut ausgehenden Reduktionswirkungen, die nach unseren Vorstellungen die Ursache des erhöhten Vagustonus sind, könnten die Blutdrucksenkung aber auch vom Sympathicus aus veranlassen, denn sie vermehren den Gehalt des Blutes an zweiwertigem Eisen und dieses ist nach neueren Untersuchungen von W. Straub[26] an den Gefäßen ein physiologischer Antagonist des Adrenalins. Auf die Möglichkeit dieses Zusammenhanges wurde vor kurzem schon durch G. Urban[27] hingewiesen, der die Reduktion des dreiwertigen zum zweiwertigen Eisen auch als unmittelbare Lichtwirkung in der Haut feststellte.

Schließlich könnten auch noch einige neuere Ergebnisse über die Wirkung des Acetylcholins auf die Skelettmuskulatur in die hier angestellten Betrachtungen einbezogen werden. Auf älteren Untersuchungen von Sommerkamp[28] fußend, haben Wachholder und Mitarbeiter gefunden, daß die einer Dauerbeanspruchung ausgesetzten „Haltungsmuskeln" wesentlich stärker auf Acetylcholin reagieren als die immer nur kurz beanspruchten „Bewegungsmuskeln[29]", und daß die Haltungsmuskeln zugleich reicher an Glutathion sind als die Bewegungsmuskeln[30]. Es liegt hier der

[23] Übersicht bei L. Pincussen: Photobiologie. Leipzig 1930. — H. Laurens: The physiological effects of radiant energy. New York 1933. — [24] Gremels, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **203**, 225 (1944). — [25] Freudenberg, K. u. Th. Wegmann: Hoppe-Seylers Z. **233**, 159 (1935). — [26] Straub, W. u. K. Stefansson: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **194**, 268 1940). — [27] Urban, G.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **203**, 306 (1944). — [28] Sommerkamp: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **128**, 99 (1928). — [29] Wachholder, K. u. J. Frhr. v. Ledebour: Pflügers Arch. **225**, 627 (1930). — [30] Wachholder, K. u. W. Quensel: Pflügers Arch. **235**, 70 (1935).

Schluß nahe, daß dieser höhere Glutathiongehalt die Wirksamkeit der Cholinesterase durch Reduktion herabsetzt und dadurch die verstärkte Reaktion auf Acetylcholin verursacht. Vielleicht hängt die schlaffe Haltung des Ermüdeten damit zusammen, daß sein Bestand an Reduktionsvalenzen abgesunken ist, wodurch eine vermehrte Aktivität der Cholinesterase in den Muskeln und damit eine abgeschwächte Reaktion auf Acetylcholin bedingt werden würde. Hierin könnte zugleich ein Schutz gegen Überbeanspruchung des erschöpften Muskels gesehen werden. Wenn dann nach erfolgter Erholung im Schlaf die Reduktionskräfte aufgefrischt sind, würde die Aktivität der Cholinesterase wieder sinken und die Haltungsmuskeln würden besser auf Acetylcholin ansprechen. Ähnlich könnte dann auch von der Muskulatur aus die belebende Wirkung des Lichtes gedeutet werden.

Das alles sind natürlich einstweilen nur Vermutungen, die sich als irrig erweisen können, doch sind feste Ausgangspunkte für die Vermutungen schon gegeben und der Weg zur experimentellen Prüfung vorgezeichnet. Es kommt darauf an, den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befund, daß die Wirkung der Cholinesterase durch ein Reduktionsmittel abgeschwächt wird, unter verschiedenen Versuchsbedingungen zu bestätigen und weiterhin zu erweisen, daß die Aktivität des Fermentes auch feineren Abstufungen des Redoxpotentials folgt.

3.

Biologisch wichtige Beziehungen des Lichtes zu Reduktionsvorgängen sind bisher nur bei der grünen Pflanze bekannt. In dieser wird die absorbierte Lichtenergie durch den Reduktionsvorgang der Kohlensäureassimilation in den entstehenden Kohlehydraten gespeichert. Das Tier führt sich die gespeicherte Lichtenergie in der Nahrung zu. In die Energiebilanz des Tieres geht daher das Licht nur mittelbar ein. Die unmittelbare Verwertung ist dem Tier nicht möglich, weil ihm der spezifische Energietransformator fehlt, den die Pflanze im Chlorophyll besitzt.

Diese Lehre ist aber nur von einer bilanzmäßigen Sicht aus richtig. Bei einer solchen kommt es auf kleinere Energiebeträge nicht an. Für die grundsätzliche Frage aber, ob nicht auch das Tier die Lichtenergie unmittelbar verwerten könne, ist jede photochemische Reaktion im tierischen Körper von Belang, bei welcher die absorbierte Energie noch gemessen werden kann. Hier interessieren die Untersuchungen von H. v. Euler[31] am System Alkohol-Methylenblau, in welchem die Oxydation des Alkohols und die Reduktion des Methylenblaus durch rotes und ultraviolettes Licht beschleunigt wird. Von Euler konnte die Energieausbeute bei dieser Lichtwirkung bestimmen. Grundsätzliche Erörterungen über die photochemische Energetik der Dehydrierungsprozesse finden sich ferner in einer Arbeit von G. Holst[32]. Diese Untersuchungen zeigen, daß bei Reaktionen, welche den von uns beschriebenen Redoxvorgängen am belichteten Hautsulfhydril unmittelbar verwandt sind, definierte Lichtbeträge verschwinden. Diese Beträge sind klein im Vergleich zu denen, welche die Pflanze für den Kohlehydrataufbau verbraucht. Vom Standpunkt einer Bilanz, die den Energiehaushalt und den Stoffumsatz der organischen Natur umfaßt, sind sie zu vernachlässigen. Das aber ist belanglos, wenn die Lichtenergie Reaktionen auslöst, die sich an Stoffen von besonderer physiologischer Funktion vollziehen, wie an Fermenten oder Hormonen. Durch Aktivitätsveränderung solcher Wirkstoffe können auch die verhältnismäßig kleinen Beträge an Lichtenergie, die der Tierkörper photochemisch zu verwerten vermag, bedeutsame Auswirkungen haben.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen Tier und Pflanze aber bleibt bestehen. Der in der Pflanze für den Reduktionsvorgang der Kohlehydratsynthese erforderliche Energiebetrag entstammt dem eingestrahlten Licht. Beim Tier stammt dagegen die

[31] Euler, H. v., Harry Hellström u. Knut Brandt: Naturwiss. **1935**, 486.
[32] Holst, G.: Radiologica **2**, 151 (1938).

für die Reduktionen benötigte Energie stets aus gleichzeitig verlaufenden Oxydationen. So ist es auch bei den Reduktionen, die in der Erholungsphase, vor allem im Schlaf, unter dem Einfluß des erhöhten Vagustonus verlaufen. Während in der Leistungsphase die durch die Oxydationen freiwerdende Energie zum größten Teil für die Muskel- und Drüsenarbeit verbraucht wird, ist das Wesen der Erholungsphase nicht nur darin zu sehen, daß die Oxydationen absolut herabgesetzt werden, sondern vor allem darin, daß die aus ihnen stammende Energie vorwiegend einem anderen Verwendungszweck zugeleitet wird. Dieser liegt eben in den regenerativen Vorgängen, die durch Reduktionen zustande kommen. Der durch die Oxydation ständig unterhaltene Kraftstrom wird am Tage zum Antrieb der Arbeitsmaschinen, in der Nacht zum Aufladen von Akkumulatoren benutzt. Die Umschaltung erfolgt durch Tonusverschiebung von der Sympathicus- zur Vagusseite. Die Kraftquelle bleibt immer der Oxydationsvorgang.

In energetischer Hinsicht grundsätzlich gleichartig sind aber auch die Vorgänge in der bestrahlten Haut, von denen unsere Überlegungen ausgegangen waren. Hier werden zugeführte Modellstoffe oder körpereigene Substanzen deshalb reduziert, weil zugleich das Hautsulfhydril oxydiert wird. Das Licht liefert nur die Anstoßenergie für diesen Vorgang. Der Fluß von Reduktionskräften, der nach unseren Vorstellungen aus der belichteten Haut in das Körperinnere gerichtet ist, wird zwar durch das Licht vermittelst fortlaufender Beseitigung einer Reaktionshemmung angelassen, jedoch gespeist aus dem Sulfhydrilvorrat der Keimschicht, der sich dabei entsprechend erschöpft. Die Frage, die zu beantworten bleibt, ist daher die nach dem Vorgang der Sulfhydrilregeneration in der Haut.

Zusammenfassung.

1. Die von ausländischen Autoren nach Untersuchungen an einer Cholinesterase aus Kaltblütergeweben geäußerte Ansicht, daß die Cholinesterase, ähnlich wie es für einige eiweißspaltende Fermente bekannt ist, ein Sulfhydril-Disulfidsystem darstelle, dessen aktive Form die Sulfhydrilform sei, trifft für die Cholinesterase des Katzenserums nicht zu, da diese durch das Sulfhydrilgift Monojodessigsäure nicht hemmbar ist.

2. Die Cholinesterase des Katzenserums wird durch das reduzierend wirkende Cystein von der Konzentration 0,1 molar an aufwärts gehemmt, durch das oxydierend wirkende Cystin dagegen in den erreichbaren Konzentrationen unbeeinflußt gelassen.

3. Es wird die Frage erörtert, ob die Cholinesterase im lebenden Warmblüterkörper durch reduzierend wirkende Stoffe gehemmt wird, die von der belichteten Haut dem Körperinneren zufließen.

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.
(Leiter: Prof. Dr. F. Büchner.)

Experimentelle und morphologische Untersuchungen zur Sauerstoffvergiftung.

Von

Joseph Pichotka und Hans Adolf Kühn.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 27. Oktober 1944.)

Nachdem über den Ablauf und den Angriffspunkt der Sauerstoffvergiftung lange Zeit hindurch keine Einigung erzielt werden konnte, erschienen in jüngster Zeit zwei Arbeiten (Pichotka, Liebegott), die in übereinstimmendem Ergebnis besondere morphologische Veränderungen des tierischen Organismus unter längerer Einwirkung hochkonzentrierten Sauerstoffs nachwiesen. Die Untersuchungen wurden von Pichotka an Meerschweinchen, von Liebegott an Mäusen, Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen, Katzen und Hunden — dem Untersuchungsgut von Clamann und Becker-Freyseng — ausgeführt. Die Versuchstiere wurden bis zum Tode oder bis zum Eintritt schwerer klinischer Erscheinungen in einer Atmosphäre mit einem Sauerstoffgehalt um 90% gehalten. Bei allen unter diesen Versuchsbedingungen gestorbenen Tieren und bei einem Teil der Tiere, die nach Eintritt schwerer klinischer Erscheinungen getötet worden waren, fanden sich Lungenveränderungen, nämlich seröse, fibrinöse und leukocytäre Exsudate in den Alveolen, wie sie schon von früheren Untersuchern beschrieben worden waren, sowie ausgedehnte Verquellungen und Verdickungen an den Alveolarwänden und den Wandungen der Alveolargänge und der Bronchioli resp. Diese Veränderungen in ihrer Gesamtheit mußten nach Ansicht der Verfasser eine erhebliche Verminderung der Sauerstoffdiffusion im Sinne einer Pneumonose mit sich bringen. Als Todesursache wurde daher bei dieser Form der Sauerstoffvergiftung eine allgemeine Hypoxämie und Hypoxydose im Gefolge der Erschwerung des intrapulmonalen Sauerstoffaustausches angenommen. Dieser Annahme fügten sich die klinischen Erscheinungen der letzten Versuchsphase ein.

Daß es sich bei der relativ langsamen Entwicklung einer Pneumonose dieser Art nicht um das Wesen der Sauerstoffvergiftung schlechthin handelt, geht schon aus Versuchen von Paul Bert hervor. Bert sah Tiere unter einem Sauerstoffpartialdruck von mehreren Atmosphären

innerhalb kurzer Zeit unter allgemeinen schweren Krämpfen zu Tode kommen. Er verglich das Krampfbild mit einer Strychninvergiftung, und alle Nachuntersucher bestätigten seine Befunde und die Übereinstimmung der beiden Vergiftungsbilder.

Bei der Bedeutung, welche die Sauerstoffatmung heute für den Höhenflug, in der Technik und in der Klinik gewonnen hat, scheint es notwendig, die Schädigungsmöglichkeiten durch den Sauerstoff genauestens zu kennen. Das ist nur möglich, wenn das Wesen der Sauerstoffvergiftung nach Angriffsort und Wirkungsweise im Organismus geklärt ist. Mit diesem Wissen ausgerüstet, wäre es wahrscheinlich nicht schwer, die verschiedenen Vergiftungsabläufe durchsichtig zu machen und, was hier noch wichtiger erscheint, brauchbare und gut begründete Regeln für eine unschädliche Anwendung der Sauerstoffatmung aufzustellen. Das Ziel aller Untersuchungen in dieser Richtung muß es also sein, das Wesen der Sauerstoffvergiftung zu erkennen, das als Gemeinsames in allen möglichen klinischen Erscheinungen des Vergiftungsablaufes enthalten ist.

I. Sauerstoffvergiftung bei Anwendung von hohem Sauerstoffüberdruck.

Die morphologische Untersuchung der Organe von Tieren, die unter einem Druck von mehreren Atm. Sauerstoff akut zu Tode gekommen sind, erscheint aus mehreren Gründen in dieser Hinsicht besonders erfolgversprechend. Einmal ermöglicht es eine Versuchsanordnung mit akutem Verlauf viel leichter, vor allem die frühen Stadien einer morphologischen Veränderung zu erfassen, und daraus auf die Art der Schädigung zu schließen. Zum anderen ist die Möglichkeit des Organismus, das klinische und morphologische Bild des Vergiftungsablaufes durch Regulationen zu verändern und evtl. undurchsichtig zu machen, weitgehend eingeschränkt. Ein Vergiftungsablauf wird als solcher um so klarer sein, je kürzer er ist, — sofern dabei nicht die Mindestzeiten für den Eintritt der verschiedenen klinischen und morphologischen Reaktionen unterschritten werden.

Daher wandten wir uns bei dem Versuch einer weiteren Aufklärung der toxischen Wirkung von hochgespanntem Sauerstoff zuerst der klinischen und morphologischen Untersuchung von Tieren zu, die im Versuch unter derart hochgespannten Sauerstoff gesetzt wurden, daß sie in einer Zeit von Minuten bis zu wenigen Stunden zu Tode kamen.

Es ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, das gesamte umfangreiche Beobachtungsgut dieser Untersuchungen anzuführen. Es wird eine zusammengefaßte Beschreibung des klinischen Verlaufes gegeben und eine Darstellung der histologischen Befunde nur insoweit, als sie für die Klärung unserer Grundfrage über Angriffsort und Wirkungsweise des hochgespannten Sauerstoffs unbedingt notwendig erscheint. Die ausführliche Darstellung der histologischen Lungenbefunde findet sich an anderer Stelle (Kühn und Pichotka).

Versuchsanordnung.

Die Versuche führten wir in einer kleinen Kammer von etwa 30 Liter Inhalt aus. Der Überdruck wurde durch direkte Verbindung der Sauerstoffbombe mit der Kammer herbeigeführt. Mit Hilfe des üblichen Reduzierventils wurde der gewünschte Druck eingestellt. Die Einstellung und Konstanthaltung des Druckes konnte an einem genau reagierenden Meßinstrument unmittelbar an der Kammer kontrolliert werden. Die Verbindung zwischen Sauerstoffbombe und Kammer blieb während des ganzen Versuches geöffnet, so daß der an der Kammer eintretende nicht unbedeutende Verlust sich automatisch bis zu der Höhe des mit Hilfe des Reduzierventils eingestellten Versuchsdruckes ergänzte und einen völlig gleichmäßigen Druck im ganzen Verlauf sicherte. Zu Versuchsbeginn wurde die Kammer kräftig mit Sauerstoff durchblasen oder einigemal bis zum Versuchsdruck aufgefüllt und wieder entleert. Hierdurch und durch den durch Undichtigkeit bedingten dauernden Nachstrom von der Sauerstoffbombe her wurde der Stickstoffgehalt in der Kammer praktisch völlig beseitigt. Analysen konnten aus technischen Gründen nicht ausgeführt werden. Die bei diesen Verhältnissen möglichen kleinen Stickstoffbeimengungen sind für unsere Fragestellung gleichgültig. Was die Zeitfaktoren des Versuchsablaufes angeht, die von dem Sauerstoffpartialdruck abhängig sind und daher bei einem gemessenen Gesamtdruck durch Stickstoffbeimischung verändert werden, so liegen die bei diesen geringen Veränderungen möglichen zeitlichen Verschiebungen weit innerhalb des Streubereiches.

Den Sauerstoff zu unseren Versuchen bezogen wir als den üblichen, aus flüssiger Luft hergestellten Handelssauerstoff (Karlsruher Sauerstoffwerke). Zur Frage der Möglichkeit schädlicher Beimengungen können wir auf die zahlreichen Untersuchungen in dieser Richtung hinweisen (Pflesser, Binger und Mitarbeiter, Orzechowski und Holste u. a.). Nach dem übereinstimmenden Ergebnis aller dieser Untersucher ist festgestellt, daß sich in dem auf diese Weise hergestellten Sauerstoff keinerlei Stoffe befinden, auf die die toxische Wirkung bezogen werden kann, daß es vielmehr der Sauerstoff selbst ist, der oberhalb einer bestimmten Konzentration die bekannten Erscheinungen der Sauerstoffvergiftung hervorruft.

Versuchstiere waren Meerschweinchen, die einzeln oder zu zweit in die Kammer eingesetzt wurden. Die Tiere, die aus der gleichen eigenen Zucht stammten, kamen unmittelbar und ohne Vorbereitung aus dem Stall in den Versuch, zum Teil nach verschieden langen Hungerzeiten. Im allgemeinen wurde der Versuch bis zum Tode des Tieres in der Kammer durchgeführt, in einem Teil wurde beim Eintritt schwerster klinischer Erscheinungen abgebrochen, und die Tiere unter Normalatmosphäre gebracht, vetl. noch längere Zeit unter Sauerstoffzuschuß. Der Tod trat auch bei diesen Tieren in fast allen Fällen spontan nach verschiedenen Zeiten ein. Die Versuchsvorbereitung durch Hunger wurde durchgeführt, weil nach Angaben verschiedener Autoren die Resistenz gegen hochgespannten Sauerstoff durch vorangehenden Hunger erhöht wird (Almeida, Campbell (1937b). Neben der klinischen Beobachtung, der Kontrolle der Atemfrequenz und Temperatur, soweit es die Versuchsbedingungen zuließen, sind hier die histologischen Befunde an Lungen und Lebern aufgeführt. Die Zahl der hier besprochenen Versuchstiere beläuft sich auf 23, die der Kontrolltiere auf 22. Die Kontrolltiere wurden in allem unter den gleichen Bedingungen gehalten wie die Versuchstiere. Die Tiere wurden unmittelbar nach dem spontan erfolgten Tode oder der Tötung seziert und die Organe in Formol, Carnoyschem Gemisch, Susa und nach Bouin fixiert. Der größte Teil des Beobachtungsgutes wurde in Paraffin eingebettet und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt, Gefrierschnitte der Leber mit Hämatoxylin-Sudan. Nach Bedarf wurden außerdem an Paraffinschnitten die Azanfärbung, sowie Färbungen mit Alaunkarmin, Mucikarmin, Bestschem Karmin und nach Mallory und Turnbull vorgenommen.

Versuchsverlauf.

Schon nach einigen Versuchen stellte sich eine klare Gesetzmäßigkeit im Ablauf der klinischen Erscheinungen heraus, sowohl in der Art der zu beobachtenden Symptome als in ihrer Aufeinanderfolge. Das zu schildernde Schema dieser Vorgänge ist nicht so zu verstehen, als ob es bei jedem Tier in allen Einzelheiten zu beobachten gewesen wäre. Es ist vielmehr ein Grundschema, in das die Beobachtungen bei allen Tieren hineingenommen werden konnten. Bei einem bedeutenden Teil der Tiere konnte es wirklich bis in alle Einzelheiten hinein beobachtet werden. Ein anderer Teil bot einen erheblich ausdrucksärmeren Verlauf. Aber fast in allen Fällen hielten wir auf Grund dieses Schemas die Versuchsführung fest in der Hand, und nur bei 2 Tieren wurden wir von plötzlichen Ereignissen, — unvermittelt einsetzenden Krämpfen oder dem unerwarteten Tod des Tieres — überrascht.

Nach der in wenigen Minuten erfolgten Druckerhöhung auf 5 ata sitzen die Tiere zunächst vollkommen ruhig in einer Ecke. Die zu Beginn durch mehrmalige Zählung ermittelte Atemfrequenz fällt von normalen Werten zwischen 80—100 je Minute auf Werte bis zu 40 oder sogar 30 Atemzügen je Minute. Dabei wird die Atmung immer ruhiger und tiefer. Dieser Zustand dauert ungefähr 40—60 Min.; gegen Ende dieser Periode ist die niedrigste Atemfrequenz erreicht. Die bis dahin vollkommen ruhig und normal erscheinenden Tiere werden jetzt unruhig. Sie schütteln sich, kratzen und putzen sich, machen eine oder mehrere Runden durch die Kammer und gehen an ihren Platz zurück, um ihn bald wieder in derselben Weise zu verlassen. Diese zeitweilige Unruhe wird meist schnell zum Dauerzustand. Die Tiere bewegen sich dann voller Unruhe in der Kammer umher, in der ersten Zeit immer wieder still sitzend, um sich zu putzen und zu kratzen. Daß es sich hierbei nicht um ein normales Verhalten handelt, läßt sich aus einer Reaktion erkennen, die bei mehreren Tieren in vollkommen gleicher Weise beobachtet wurde. Diese Tiere schlugen sich während des Putzens immer wieder mit der kralligen Vorderpfote in die Gegend der Schnauze und der Nasenlöcher, als wenn sie dort eine schwere, lokalisierte Mißempfindung hätten. Auch manches andere Verhalten wies auf solche Erscheinungen hin. Während dieser Vorgänge war manchmal schon ein geringer Verlust der groben Kraft und das Eintreten einer Ataxie an den Gliedmaßen zu bemerken. Diese Ataxie war anscheinend zum Teil durch Spasmen, zum Teil durch beginnende schlaffe Lähmung bedingt, und zwar zeigten die Vorderextremitäten fast immer spastische Veränderungen der Stellung und der Bewegung, während an den Hinterbeinen häufiger ein Verlust der groben Kraft zu sehen war. Überhaupt waren immer zuerst Veränderungen an den Hinterbeinen zu bemerken. Ein in allen Fällen sehr frühzeitig eintretendes Symptom war der Opisthotonus der Nackenmuskulatur, der manchmal so aus gesprochen war, daß nach jeder aktiven Abwärtsbewegung des Kopfes derselbe sichtbar ruckweise wieder in die Höhe gehoben wurde. Ein Tier, bei dem dieses Stadium sehr ausgeprägt war, stolzierte mehrere Minuten in spanischem Schritt mit weit in den Nacken geworfenem Kopf umher. Gleichgewichtsstörungen wurden verschiedentlich als Verdrehung des Kopfes, Zirkusgang und Kreisbewegungen beobachtet.

Noch einige andere auffällige Erscheinungen waren zu beobachten. Während das Fell der Tiere anfänglich von normaler Beschaffenheit war, sträubte es sich in der Zeit, da die Tiere unruhig wurden, sehr stark, und zwar manchmal plötzlich. Etwa in derselben Phase des Ablaufs, meist aber schon früher, begannen die Tiere alles anzufressen, was ihnen erreichbar war. Sie knabberten an den Metallrahmen, an Kunstharzfassungen und Gummidichtungen. Sie fraßen den Zellstoff des Boden-

belages ab oder saßen manchmal viele Minuten lang auf derselben Stelle und kauten mit groben stereotypen Bewegungen, ohne irgend etwas in der Schnauze zu haben. Die Augen gingen dann hin und wieder ruckartig in Schlafstellung und das ganze Tier bot dieses Aussehen. Als letztes der hierher gehörigen Symptome trat ein besonders eindrucksvolles Phänomen ein. Die Augen, die außer der zeitweiligen Schlafstellung nichts Auffälliges geboten hatten, begannen plötzlich zu tränen. Kurze Zeit später wurde der Inhalt der Bindehautsäcke gewissermaßen unter den Händen trüb, bis er eine vollkommen undurchsichtige, weiße, eitrige Masse darstellte. Dieses Auftreten des trüben gelblichen Sekretes in den Bindehautsäcken geschah so schnell, daß man manches Mal kugelige Tropfen sich bilden und über den Lidrand herablaufen sah.

Das Stadium der Krämpfe wurde mehrfach in völlig übereinstimmender Weise durch einen Ausbruchsversuch der aufs äußerste verängstigten Tiere eingeleitet. Die Tiere richteten sich plötzlich an der Kammerwand auf und suchten überall nach einem Ausweg. Während der ganzen Experimente wurde diese Reaktion fast nie außerhalb dieser Phase der beginnenden Krämpfe beobachtet. In dieser aufgerichteten Stellung an der Wand wurden die Tiere gewöhnlich vom ersten Krampf überfallen, so daß sie hintenüber auf den Boden der Kammer schlugen. Die dann oft mehrere Minuten anhaltenden Krämpfe waren von solcher Gewalt, daß die auf dem Rücken liegenden Tiere nicht selten bis unter die Decke der Kammer geschleudert wurden. Die Stärke und Dauer der Krämpfe, der Ablauf von Krampfphasen und dazwischen liegenden Zeiten der Beruhigung boten das vielfältige Bild, das man auch von anderen experimentell herbeigeführten Krämpfen, z. B. im Unterdruck, kennt.

Bei 7 Tieren setzte unmittelbar mit dem ersten Krampf schwere Schnappatmung ein, die unter abnehmender Frequenz meist rasch (1—6 Min.) zum Tode führte. Bei 10 Tieren kam es überhaupt nicht zu Krampferscheinungen. Im Stadium des unruhigen Umherlaufens und der vegetativen Reizerscheinungen setzte ganz unvermittelt Schnappatmung ein, und zwar in einem nach dem Benehmen der Tiere durchaus ungefährlichen Stadium. Die Tiere liefen dann meist in vollem Besitz ihrer Bewegungsfähigkeit mit Schnappatmung umher und boten so ein besonders eindrucksvolles Bild. Sie kamen ebenfalls unter abnehmender Frequenz der Schnappatmung zu Tode. Bei einem Tier war die Schnappatmung das erste auffällige Symptom, das in 3 Min. zum Tode führte. Wir sahen die Schnappatmung in diesen Versuchen überhaupt sehr häufig bei erhaltener Bewegungsfähigkeit der Tiere, und ohne sonstige sichtbare Störungen, während wir sie bisher bei Meerschweinchen nur im Unterdruck bei weitgehender Reaktionslosigkeit gesehen hatten. Prikadlowizky machte die gleiche Beobachtung an Mäusen. Die kritische Frequenz der Schnappatmung lag bei 12—14 Atemzügen je Minute. Bis zu dieser Frequenz erfolgte eine langsame und gleichmäßige Abnahme, nach ihrem Erreichen meist starke Unregelmäßigkeit. Dann trat im allgemeinen schnell der Tod ein. Die gleichen Beobachtungen konnten wir auch in zahlreichen Versuchen mit tödlicher Höhenbelastung von Meerschweinchen machen. Diese Schwelle der Atemfrequenz ist der Ausdruck eines kritischen Funktionszustandes des Atemzentrums. Bei Beendigung des Höhenversuches mit einer Frequenz der Schnappatmung oberhalb 12—14 Atemzügen werden praktisch alle Tiere gerettet, unterhalb dieser Schwelle nur ein Teil. Dementsprechend waren in unseren Versuchen immer langsame Abnahme der Atemfrequenz und lange Überlebenszeit miteinander gekoppelt; umgekehrt war bei schneller Abnahme der Atemfrequenz mit kurzer Versuchszeit zu rechnen. Die Kurven der Abnahme der Atemfrequenz verliefen also regelmäßig und sehr ähnlich, einmal flacher, einmal steiler. Von der kritischen Frequenz von 12—14 Atemzügen je Minute an wurden sie unregelmäßig.

Der Großteil der Tiere bot ein langdauerndes, differenziertes und symptomenreiches Krampfstadium, dessen ausführliche Beschreibung den Lesern dieses Archivs

nichts Neues bieten würde. Die Erscheinungen unterschieden sich nicht von denen, die man etwa nach Krampfgiften beobachtet.

Besonderer Beachtung bedarf ein Verhalten, das bei einem bedeutenden Teil der Tiere zu beobachten war. In dem Versuchsstadium vor Beginn der Krampfanfälle und zum Teil auch noch in das Krampfstadium hineinreichend, benahmen sich diese Tiere so, als ob eine mechanische Behinderung der oberen Luftwege vorläge. Sie bewegten sich rückwärts, indem sie gleichzeitig mit den Vorderpfoten etwas aus dem Rachen zu entfernen versuchten. Dabei brachten sie unter größter Anspannung der Atemmuskulatur eigenartige, fast stridoröse Klagelaute hervor. Das ganze Bild war etwa so, wie wenn dem Tier die Schnauze zugehalten würde. Eine Ursache für dieses Verhalten, etwa ein Glottisödem, konnte bei diesen Tieren bei der Sektion nicht aufgedeckt werden. Zu solchen Beobachtungen sind die Organe des Meerschweinchens wenig geeignet.

Eine auffällige Differenz bestand zwischen der Farbe der sichtbar durchbluteten Teile während des Versuches in der Kammer und unmittelbar nach Verbringen der Tiere an die Außenluft. Während die Ohren, die Pfoten und die Nase in der Kammer von einer intensiv kirschroten Färbung waren, trat unmittelbar nach Verbringen an die Außenluft eine bläulich-blasse Verfärbung an deren Stelle. Die in der Kammer zu Tode gekommenen Tiere behielten meist die intensive Rotfärbung der Haut und Schleimhaut bei und wiesen sie bei der Sektion auch an den inneren Organen auf.

Eine schematische Zusammenfassung des gesamten klinischen Vergiftungsablaufes hat folgendes Aussehen:

I. Stadium. Vollkommene Ruhe, starke Abnahme der Atemfrequenz.

II. Stadium. Mißempfindungen (Kratzen, Putzen, Beißen). Starke Unruhe. Atemfrequenz meist nicht zu zählen, aber stark zunehmend (Bewegung).

III. Stadium. a) Vegetative Symptome: Sträuben des Felles. Zwangsmäßiges Anfressen aller Gegenstände, stereotypes Kauen. Tränen und Sekretbildung an den Augen. (Seltener: Schnappatmung ohne Krampferscheinungen bei gut erhaltener Bewegungsfähigkeit.) Bei einem Teil der Tiere klinisches Bild der Erstickung. b) Motorische Symptome: Spastische Stellung und Bewegung, vor allem der Vorderfüße. Opisthotonus, Gleichgewichtsstörungen, Verdrehen des Kopfes, Zirkusgang, Abnahme der groben Kraft, beginnende Ataxie an den Hinterbeinen.

IV. Stadium. Typischer Ausbruchsversuch. Schwere Streckkrämpfe von verschiedener Intensität und Dauer, die meist von klonischen Krämpfen bis zur Erschöpfung gefolgt werden. Ausgebildete schlaffe Lähmung und Ataxie, vor allem der hinteren Extremitäten, zum Teil bei bestehendem Opisthotonus. Schnappatmung.

Entsprechend den Versuchen von Almeida und Campbell (1937) scheint sich bei Hungertieren im Versuch eine Abnahme der Krampfbereitschaft einzustellen, vor allem bei längerem Hunger. Eindeutig sind die Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen nicht. Eine Verlängerung der Überlebenszeit war in unseren Versuchen nicht festzustellen.

Auffällig ist das Verhalten der Körpertemperatur unter hochgespanntem Sauerstoff, was schon von vielen Autoren erwähnt wurde. Im allgemeinen stellten wir in Übereinstimmung mit vorausgegangenen Untersuchungen eine Senkung der Körpertemperatur fest, die einen außerordentlich großen Streubereich aufweist. Bei einem durchschnittlichen Verlust von 5^0 bis zum Todeseintritt liegen die Einzelwerte zwischen 0 und $15{,}0^0$. Dieser große Streubereich und das gelegentliche Fehlen der Temperaturverminderung läßt vermuten, daß hier keine einfachen Verhältnisse vorliegen. Leider war es uns technisch unmöglich, eine fortlaufende Temperaturschreibung während des ganzen Versuchsverlaufs durchzuführen und somit eine Beziehung herzustellen.

In einigen Fällen, in denen wir schwer gefährdete Tiere schnell unter Normalluft brachten, um sie lebend zu erhalten, sahen wir Bilder wie sie bei schneller Beseitigung starken Unterdruckes als Repressionskrämpfe bekannt sind, mit typischen Lauf- und Paddelbewegungen.

Es war im allgemeinen schwer, Tiere am Leben zu erhalten, nachdem bereits schwere klinische Symptome eingetreten waren. Die Tiere gingen meist bald darauf ein. Sauerstoffzuschuß schien nach dem Verbringen an Normalluft günstig zu wirken. Doch ist die Zahl unserer hierhergehörigen Fälle zu gering, um einen Schluß daraus ziehen zu können. Von ausgezeichneter Wirkung in diesem Zustande war schnelle und starke Erwärmung. Dieses war der einzige Weg, auf dem es uns gelang, schwerst geschädigte Tiere für längere Zeit oder ganz am Leben zu erhalten. Bei den dauernd überlebenden Tieren entwickelten sich im Laufe der ersten Tage mehrfach mehr oder minder starke Nekrosen an Ohren, Nasenspitze und Zehen, die das gleiche Aussehen und den gleichen Verlauf zeigten wie Erfrierungen. Wegen der Besonderheit des Verhaltens von überlebenden Tieren sie hier ein entsprechender Versuchsverlauf ausführlich angegeben.

Das Tier Ü 78 wurde nach 50 Stunden Hungerns unter 5 Atm. Sauerstoff gebracht. Nach etwa $1^1/_2$ Stunden befand es sich im Zustand schwerer Schnappatmung, ohne daß Krämpfe vorausgegangen wären. In diesem Zustand wurde es wieder unter Normaldruck versetzt und zunächst Sauerstoff zugegeben, bis es außer Gefahr war. Die Temperatur betrug bei Versuchsende 33,5°. Trotz Verpackens in Watte sank sie dann in $1^1/_2$ Stunden weiter auf 13,0°. Das Tier wurde nun mit der Heizsonne aufgewärmt. In den Wärmezeiten erreichte es ungefähr normale Körpertemperatur. Nach Absetzen der Heizung sank die Temperatur sehr schnell auf Werte zwischen 33 und 35°. Es entwickelte sich hierzu eine starke Erschwerung der Ein- und Ausatmung, und nach 45 Stunden kam es unter erneuter starker Temperatursenkung und schwerster Atembehinderung und Lungenödem zu Tode.

Dieses Verhalten der Wärmeregulation ist ungewöhnlich. Im allgemeinen regulieren Meerschweinchen nach Abkühlung bis auf 25° für erheblich längere Versuchszeiten, als sie hier vorlagen, mit Sicherheit selbständig wieder ihre Normaltemperatur ein. (Eigene Beobachtung: Pichotka.) Es kann sich also bei diesem Vorgang nicht nur um eine unmittelbare durch die Versuchsbedingungen herbeigeführte Senkung der Körpertemperatur handeln, sondern es muß ein fortdauernder Schaden eingetreten sein, der das Bestehenbleiben der Hypothermie bedingt. In weniger schwerem Zustand der Versuchskammer entnommene Tiere konnten kurze Zeit darnach wieder völlig erholt erscheinen, wie es auch von Almeida beschrieben wurde. Auch diese Tiere kamen in einzelnen Fällen Stunden später unter Lungenödem zu Tode. Bei diesen Tieren lag eine fast symptomfreie Latenzzeit zwischen dem Ende der Versuchsbelastung und dem tödlichen Lungenödem. Hier ist also grundsätzlich der gleiche Vergiftungsablauf möglich, wie er bei Vergiftung mit Phosgen und nitrosen Gasen beschrieben wurde.

Daß diese Verhältnisse für die Sauerstoffvergiftung viel schwerer darzustellen sind als für die Gasvergiftungen, ist in der relativ geringen Giftigkeit des Sauerstoffs und der Besonderheit seines Wirkungsmechanismus begründet. Nur die stärksten Belastungen,die gerade noch mit dem Leben vereinbar sind, zeigen jenes Fortwirken der Schädigung, das für das Phosgen schon in kleinen Mengen typisch ist.

Die allgemeinen Versuchsdaten sind aus der Tabelle zu entnehmen (Tabelle 1).

Die morphologischen Befunde.

1. Sektionsbefund. Die Lungen waren stets vergrößert, manchmal auf das Doppelte ihres gewöhnlichen Volumens. Die Konsistenz war luftkissenartig, die Oberfläche und Schnittfläche war unregelmäßig gefleckt von bräunlich bis gelblich bis tief dunkelrot.

Tabelle 1. *Beobachtungsgut der Sauerstoffüberdruck-Versuche.*

Nr. des Tieres	Gewicht g	Geschlecht	Hunger: Stunden	Hunger: Gewichtsverlust	Druck ata	Versuchsdauer Min.	Zeit bis zum Eintritt der Krämpfe Min.	Dauer der Krämpfe Min.	Dauer der Schnappatmung Min.	Zeit nach dem Versuch bis zum Tode	Temperatur: Anfang °C	Temperatur: Ende °C	
Ü 13	400	♂	—	—	4	415 +	245	100	70		37,5	—	Normale Fütterung
Ü 14	440	♀	—	—	4	96 +	—	—	6		38,5	—	
Ü 15	370	♂	—	—	4	370	—	—	26	23 Min. nach Versuch durch Dekapitation	38,5		
Ü 0	440	♂	—	—	5	92 +	88	3	4		37,5	34	
Ü 2	370	♀	—	—	5	305	119	171	182	Anschliessend an Versuch durch Dekapitation	37,5	22,5	
Ü 5	500	♂	—	—	5	63 +	—	—	3		38,8	35,5	
Ü 6	525	♂	—	—	5	99 +	—	—	1		38,8	—	
Ü 8	460	♂	—	—	5	205 +	145	65	10		38,5	35,5	
Ü 79	480	♀	—	—	5	98 +	—	—	3		37,2	36,5	
Ü 83	450	♂	—	—	5	117	54	99	69	36 Min. spontan	38,0	28,6	
Ü 87	540	♂	—	—	5	80 +	77	3	3		37,5	35,0	
Ü 16	325	♀	—	—	5,8	85	51	34	25	Überlebt	37,0	29,5	
Ü 17	295	♀	—	—	5,8	140	70	70	80	$4^1/_2$ Tage spontan	38,5	27,0	
Ü 18	340	♀	—	—	5,7	85	37	19	59	$3^1/_2$ Std. spontan	39,0	25,5	
Ü 1	430	♀	$80^1/_2$	90 g 21 %	5	100	—	—	1	5 Tage spontan	37,5	36,8	Hunger
Ü 3	440	♂	80	100 g 23 %	5	69 +	—	—	1		37,5	—	
Ü 4	385	♀	$80^1/_2$	100 g 26 %	5	95	—	—	1	5 Tage spontan	37,3	38,8	
Ü 7	510	♂	80	120 g 23,5 %	5	63 +	62	1	1		—	32,0	

Tabelle 1 (Fortsetzung).

Nr. des Tieres	Gewicht g	Geschlecht	Hunger		Druck ata	Versuchsdauer Min.	Zeit bis zum Eintritt der Krämpfe Min.	Dauer der Krämpfe Min.	Dauer der Schnappatmung Min.	Zeit nach dem Versuch bis zum Tode	Temperatur	
			Stunden	Gewichtsverlust							Anfang °C	Ende °C
Ü 78	390	♀	50	25 g 6,5%	5	94 +	—	—	1	2 Tage spontan	38,0	33,5
Ü 80	460	♀	50	30 g 6,5%	5	109 +	—	—	17		37,0	31,8
Ü 84	440	♂	27	0 —	5	105 +	101	4	4		38,2	35.2
Ü 88	460	♂	36	10 g 2,2%	5	117 +	62	55	39		38,0	31,5
Ü 89	540	♀	36	20 g 3,7%	5	116 +	88	28	28		37,0	36,5

Außerdem hatte man auf der Schnittfläche den Eindruck von großem Blutreichtum. In sämtlichen Lungenabschnitten und meist auch in der Trachea fand sich reichlich schaumiges Ödem. Das Herz war meist in allen vier Kammern dilatiert und mit Blut gefüllt. Leber und Nieren dunkelrot gestaut. In den Nebennieren wurden einige Male Rindenblutungen gesehen.

2. Histologische Befunde. Für die in Frage stehenden Probleme sind die Lungen und Leberbefunde am wichtigsten. Sie sind daher in Ausführlichkeit besprochen. Die anderen Organe werden nur insoweit erwähnt, als es für das Anliegen dieser Arbeit notwendig ist.

Lunge. Die Lungenbefunde dieser Versuchsgruppe bieten in zahlreichen Punkten ein einheitliches Bild, zeigen dagegen in anderen erhebliche Abweichungen untereinander. Bei fast allen Tieren finden sich in geringerer oder stärkerer Weise ausgeprägt eine starke Blutfüllung der Gefäße und der Kapillaren, außerdem abschnittsweise eine akute Blähung der Alveolargänge und der Alveolen. Daneben sieht man immer wieder atelektatische Bezirke. Auf verschieden stark entfaltete Bezirke stößt man grundsätzlich auch bei unbehandelten Kontrollmeerschweinchen, doch ist die wechselnde Entfaltung der einzelnen Lungenabschnitte bei normalen Tieren im allgemeinen nicht so deutlich ausgeprägt, wie wir sie bei unseren Versuchstieren gefunden haben. Daß wir es hier mit Blähungszuständen der Alveolen zu tun haben, die das normale Maß erheblich überschreiten, beweisen die immer wieder zur Beobachtung kommenden Bilder von Einrissen der Alveolarsepten, welche besonders strukturlos gewordene und homogenisierte Septen betreffen. In den wenigen stark geblähten Gebieten enthalten die Alveolen fast durchweg ein feinfädiges bis körniges, teilweise auch homogenes eosingefärbtes Exsudat, das sich bei der Weigert-Färbung im allgemeinen nicht anfärbt, also kein Fibrin enthält. Nur bei einem Tier, das den Versuch länger überlebt hatte, konnten wir auch Fibrin in den Alveolen nachweisen. Dagegen fanden sich bei fast allen Tieren abgeschilferte Alveolarepithelien in der Lichtung der Alveolen, teilweise in großer Menge, so daß das Bild eines echten Desquamativkatarrhs bestand. In den Alveolarsepten fiel bei einem Teil der Tiere, hauptsächlich bei denen, die die beschriebenen Veränderungen am stärksten ausgeprägt gezeigt hatten, ein besonderer Reichtum an gelapptkernigen Leukocyten auf, deren Auswanderung aus den Kapillaren vielfach beobachtet wurde. Auch in den Alveolen fanden sich an einzelnen Stellen Ansammlungen von Leukocyten zwischen den abgeschilferten Alveolarepithelien, ohne daß man von dem Bild einer echten Broncho-

pneumonie sprechen konnte. Das perivaskuläre Gewebe war stets sehr stark aufgelockert und hatte gewöhnlich das Mehrfache der normalen Ausdehnung. Die zahlreichen weiten Spalten waren mit blaß gefärbtem homogenem Inhalt angefüllt. Die Lymphgefäße waren strotzend gefüllt. Auch das peribronchiale Gewebe war häufig ödematös aufgelockert und verbreitert. An den Erythrocyten fiel in einzelnen Kapillarabschnitten ein Verlust ihrer Färbbarkeit auf.

Bei den meisten Tieren fanden sich Blutungen in die Alveolen, meistenteils am Rande geblähter Bezirke, hin und wieder auch im Inneren eines solchen Bezirkes, selten in weniger entfalteten oder atelektatischen Gebieten.

Bemerkenswerte Bilder zeigten sich weiterhin an den Bronchien und Bronchiolen. Es fanden sich Nekrosen des Epithels, dessen Zellen teilweise in großem Umfange abgestoßen waren, und dessen nekrotische Elemente dann in einer offenbar aus geronnenem Exsudat bestehenden und das Lumen der Bronchien fast völlig ausfüllenden Masse lagen, vermischt mit gelapptkernigen Leukocyten. Auch reichliche Durchwanderung von Leukocyten durch das Epithel und die Kapillarwände wurde beobachtet. An einigen Stellen fand sich eine starke, durch den Ausfall der Mucikarminfärbung erkenntliche Schleimsekretion des Bronchialepithels, teilweise in einem solchen Ausmaß, daß das Lumen des Bronchus durch den Schleimpfropf vollständig verschlossen wurde. An anderen Stellen zeigte sich eine Vakuolisierung der Epithelzellen.

Diese Veränderungen fanden sich in ihrer Gesamtheit bei allen Tieren in mehr oder weniger starker Ausprägung.

Bezüglich der für die Sauerstoffvergiftung unter Normaldruck so charakteristischen Wandveränderungen der Alveolen, Alveolargänge und Bronchioli resp. zeigten unsere Versuchstiere dagegen ein verschiedenes Verhalten. Bei 8 Tieren konnten wir überhaupt *keine in diesem Sinne zu deutenden Veränderungen* wahrnehmen. Es handelte sich hier zum größten Teil um Tiere mit einer Versuchszeit um 100 Min., vom Versuchsbeginn bis zum Eintritt des Todes in der Versuchskammer gerechnet. Diese Gruppe enthält nur ein Tier mit einer längeren Versuchszeit (330 Min.). Bei 4 Tieren fanden sich Andeutungen von homogenen Bandbildungen an den Alveolarwänden und besonders an den vorspringenden Pfeilern der Alveolargänge. Hier handelte es sich um Tiere mit den gleichen Versuchszeiten wie in der 1. Gruppe, mit Ausnahme eines Tieres, das 4 Stunden nach Versuchsende in klinisch völlig erholtem Zustande getötet wurde.

Bei 4 weiteren Tieren schließlich waren diese Veränderungen zwar deutlich erkennbar, aber auf umschriebene Bezirke des Präparates begrenzt. Bei diesen Tieren lagen die Versuchszeiten mit einer Ausnahme über 100 Min.

Nur bei 2 Tieren fanden wir in großer Ausdehnung die typischen breiten hyalinen Säume an den Wandungen der Alveolen, den vorspringenden Leisten der Alveolargänge und der Bronchioli resp. Hier handelte es sich um Tiere mit langen Versuchszeiten (bis 285 Min.), die außerdem nach Beendigung des Versuches noch längere Zeit überlebt und sich anfänglich wieder erholt hatten, um dann schließlich an der Außenluft unter den Erscheinungen des Lungenödems spontan zu verenden.

Zusammenfassend können wir feststellen, daß die Lungenveränderungen nach Belastung mit hochgespanntem Sauerstoff ein vielfältiges Bild zeigen können. Bei den akut in kurzen Versuchszeiten (etwa 100 Min.) zu Tode gekommenen Tieren finden sich Hyperämie, Lungenblähung und Atelektase in einem die Norm übersteigenden Ausmaß, geringes bis mäßiges alveoläres und perivasculäres Ödem und meist geringe Desquamation des Alveolarepithels, sowie in wechselndem Ausmaß Blutungen in die Alveolen. Das Bild der stärkstmöglichen Veränderungen dieses Organs findet sich bei Tieren, die *nach Versuchsende mit einigen Stunden Abstand* an den erlittenen Schädigungen spontan eingingen. Neben einer Verstärkung der vorhergehend genannten Veränderungen finden wir hier zahlreiche Zerreißungen von Alveolarsepten durch übermäßige Blähung, zum Teil ausgedehnte Blutungen in die Alveolen, fibrinöses Exsudat und starke hyaline Bandbildungen an den Bronchiolen, Alveolargängen und Alveolenwandungen. Dazwischen stehen die Befunde bei einem Teil der akut im Versuch zu Tode gekommenen Tiere, zumeist der Gruppe mit längeren Versuchszeiten zugehörig. Bei diesen finden sich die charakteristischen Verquellungen angedeutet oder in geringerer Stärke und Ausdehnung ausgebildet, die anderen Veränderungen ebenfalls in wechselnder Ausprägung.

Zum Schluß muß noch auf eine andere charakteristische Veränderung aufmerksam gemacht werden, die nur bei den länger überlebenden Tieren zu beobachten war. Es handelt sich um Veränderungen, die die Kapillarinhalte betreffen und die zum Teil in Kapillaren der Alveolarsepten, zum Teil aber auch in anderen Kapillarstrecken zur Beobachtung gelangen. Es handelt sich um eine Homogenisierung des Kapillarinhaltes, der als strukturlose lebhaft eosingefärbte Masse zur Darstellung gelangt und nur an geeigneten Stellen bei stärkster Vergrößerung zum Teil noch eine feine Gliederung nach Art zusammengesinterter Erythrocyten erkennen läßt. Auch an größeren Gefäßen gelangen hier und da hyaline Thrombenbildungen zur Beobachtung.

Der Agglutination des Kapillarinhaltes geht eine Veränderung der Kapillarwandungen voran. Besonders an den alveolarwärts gelegenen konvexen Bögen der Kapillarschlingen sehen wir eine Verbreiterung, Homogenisierung und starke Eosinfärbbarkeit der Wandung. Die strotzend gefüllten Kapillaren erscheinen in diesen Abschnitten besonders stark verbreitert. Diese Kapillarveränderung kann auf alle Gebiete des Kapillarnetzes übergreifen.

Die genaueren morphogenetischen Zusammenhänge bei der Entwicklung der Lungenveränderungen sowie ihre ätiologische Deutung sind an anderer Stelle dargestellt worden (Kühn und Pichotka).

Leber. Die Leber der mit Hunger vorbehandelten Tiere wurden in diesem Zusammenhang nicht mit ausgewertet. An Kontrolltieren stellte sich heraus, daß längerer Hunger verschiedenartige Verfettung und Vakuolisierung der Leber hervor-

rufen kann. Daher schlossen wir trotz deutlicher Unterschiede im histologischen Befund der Leber zwischen Hunger-Kontrolltieren und Hunger-Versuchstieren sämtliche Tiere, die vor dem Versuch gehungert hatten, von der histologischen Bewertung aus und verwandten nur die einfachen und übersichtlichen Ergebnisse bei unvorbereiteten Versuchstieren.

In den Ergebnissen sind ebenso wie bei den histologischen Befunden der Lunge deutlich zwei Gruppen zu unterscheiden: Lebern von Tieren, die akut im Versuch innerhalb einer bis mehreren Stunden zu Tode kamen, und solche von Tieren, die im Anschluß an die Versuchsbelastung nach einiger Zeit an der erlittenen Schädigung eingingen.

Bei den akut im Versuch eingegangenen Tieren finden sich in allen Lebern Veränderungen in der *Peripherie* der Läppchen, und zwar handelt es sich um eine von peripher nach zentral abnehmende Vakuolisierung und Verfettung. Diese Veränderungen sind bei Tieren mit kurzen Versuchszeiten sehr gering ausgebildet. Aber da wir und andere Untersucher in der normalen Meerschweinchenleber niemals Fett außer in Form der physiologischen Verfettung, d. h. der Verfettung einzelner Zellen ohne feste Ordnung innerhalb des Läppchens, vorfanden, lassen sich die Veränderungen gut abgrenzen. Zudem finden sie sich immer in engster Beziehung zum peripheren Gefäßbündel und bilden mit den Fällen mit stärkeren Veränderungen in der Läppchenperipherie eine kontinuierliche Reihe.

Mit Ausnahme eines Falles finden sich Vakuolen und Fetttropfen immer nebeneinander. Außerdem sieht man zahlreiche unvollständige Fetttropfen, angefangen von den schmalsten Sichelformen innerhalb eines aufgehellten Kreises bis zu fast vollrunden Fetttropfen, die als fließende Übergänge zwischen den Vakuolen und vollausgebildeten Tropfen stehen. Alle diese Zelleinschlüsse sind dem Kapillarpol zugeordnet.

Wir können alle in der Läppchenperipherie auftretenden Veränderungen als ätiologisch einheitlich, auf verschiedenen morphologischen Entwicklungsstufen stehend auffassen. Die Vakuolen mit ihrem eiweißartigen Inhalt sind als die jüngsten Stadien anzusehen, während die vollausgebildeten Fetttropfen ein Endstadium darstellen. Zwischen beiden liegen die vielfältigen Bilder der Übergangsformen.

Nur bei einigen Versuchstieren dieser Gruppe finden sich neben den peripheren Veränderungen auch solche des *Läppchenzentrums*. Es handelt sich um wenige, meist nur einzelne grobe fettfreie Vakuolen in den innersten Zellagen um die Zentralvene. Das Kaliber der peripheren und zentralen Vakuolen ist deutlich zugunsten der zentralen Vakuolen unterschieden. Ebenso sind die beiden Veränderungen durch eine meist breite unveränderte intermediäre Zone voneinander getrennt.

Bei keinem der zahlreichen Kontrolltiere aus dem gleichen Stall fanden sich ähnliche Veränderungen.

Der morphologische Befund der Leber bei der in kurzer Zeit tödlichen Vergiftung durch hochgespannten Sauerstoff ist also im wesentlichen eine periphere perivaskuläre Verfettung. Das ist die Verfettungsform, die wir bei vielen toxischen Zuständen vorfinden, und die erst kürzlich von Sachs nach den Untersuchungen an einem großen Sektionsgut als die „toxische Verfettung" bezeichnet worden ist.

Bei den Tieren, die im Anschluß an die Versuchsbelastung zunächst überlebten, dann aber in einer Zeitspanne von mehreren Stunden bis zu Tagen an der erlittenen Schädigung eingingen, ist ein anderer Befund zu erheben. Zwar finden sich auch bei diesen Tieren die gleichen peripheren Veränderungen des Leberläppchens in deutlicher Ausprägung, aber dieser

Befund steht nicht mehr im Vordergrund. Vielmehr überwiegen hier durchaus die zentralen Veränderungen. Sie bewegen sich zwischen ausgedehnter zentraler Vakuolisierung und Verfettung und weitgehenden, von zentral nach peripher fortschreitenden Nekrosen. Alle diese Veränderungen des Läppchenzentrums sind als Ausdruck einer schweren Hypoxydose gesichert.

Tiere, die die Versuchsbelastung ohne klinisch nchweisbaren Schaden überlebten und im Abstand von mehreren Stunden nach Versuchsende getötet wurden, zeigten nur geringe periphere Veränderung. Zentrale Veränderungen fehlten vollständig. Diese Tiere müssen dem Befund nach zur 1. Gruppe gezählt werden.

Zusammenfassung.

1. Unter einer Sauerstoffspannung von 3,5—5,8 ata gehen Meerschweinchen und Kaninchen in einem Zeitraum von einigen Stunden zugrunde. Die Zeit bis zum Tode nimmt mit der Erhöhung des Sauerstoffdruckes ab. Sie beträgt bei Meerschweinchen unter 5 ata Sauerstoff durchschnittlich 95 Min. (Durchschnitt aus 10 Versuchen: Minimal 62 Min., maximal 117 Min.).

2. Der klinische Ablauf der Vergiftung zeigt ein gesetzmäßiges Verhalten in bezug auf die Art und die Reihenfolge der auftretenden Symptome. Im Vordergrund stehen Reiz- und Lähmungserscheinungen des Nervensystems, die in schweren generalisierten Streckkrämpfen ihren Höhepunkt erreichen.

3. An den untersuchten Organen — Lunge und Leber — finden sich charakteristische Veränderungen. Diese bestehen für die *Lunge* in Erweiterung und starker Füllung des Kapillarsystems, dem Auftreten serösen Exsudates mit Abschilferung von Alveolarepithelien, Blutungen in die Alveolen und intrakapillären Agglutinationsthrombosen. Diese Veränderungen sind insgesamt als Folge einer Schädigung des Kapillarkreislaufs der Lunge anzusehen. *Sie erreichen im allgemeinen nur geringe Ausdehnung und gewinnen sicherlich keinen entscheidenden Einfluß auf den Gasaustausch in der Lunge.*

In der *Leber* finden sich bei allen im Versuch gestorbenen Tieren periphere und in einigen Fällen geringe zentrale Veränderungen.

4. Tiere, die den Versuch zunächst überlebten und dann mit einigem Abstand vom Versuchsende zu Tode kamen, starben unter dem Bild der Atemerschwerung und des Lungenödems. Bei diesen sind die Lungenveränderungen schwer und ausgedehnt, vor allem finden sich die hyalinen Bandbildungen an den Wandungen der Alveolen und Alveolargänge in stärkstem Maße. In der Leber finden sich neben den gleichen peripheren Veränderungen wie bei akut im Versuch gestorbenen Tieren schwere zentrale Veränderungen, wie sie für die tödliche Hypoxämie charakteristisch sind.

II. Sauerstoffvergiftung durch erhöhten Sauerstoffteildruck bei unverändertem Gesamtdruck.

In den vorgehend erwähnten Untersuchungen (PICHOTKA, LIEBEGOTT, waren die Versuchstiere unter einer Sauerstoffspannung von etwa 90% einer Atmosphäre gehalten worden. Die sich dabei entwickelnden Lungenveränderungen hatten beide Autoren als im Sinne einer Pneumonose wirksam gedeutet und nach dem klinischen Verlauf eine durch diese Pneumonose herbeigeführte Hypoxämie als Todesursache angesehen.

Nachdem aus den Ergebnissen der vorhergehenden Versuchsgruppen wesentliche Schlüsse über die Wirkung des hochgespannten Sauerstoffs gezogen werden konnten, sollte mit Hilfe dieser Kenntnisse eine Aufklärung des offenbar komplizierteren pathogenetischen Ablaufes der Sauerstoffvergiftung bei normalem Gesamtdruck versucht werden.

Versuchsanordnung.

Die Untersuchungen dieser Versuchsgruppe wurden zum Teil in einer 60 Liter fassenden Glaskammer, zum Teil in einer Unterdruckkammer von etwa 150 Liter Inhalt ausgeführt. Versuchstiere waren Meerschweinchen, die in vier Versuchsreihen von je 4 Tieren verwandt wurden (Versuchsreihe A, B, G, F) und in einer Versuchsreihe (K) Kaninchen. Insgesamt belief sich die Zahl der Versuchstiere auf 16 Meerschweinchen und 3 Kaninchen. Die Meerschweinchen wurden zu viert in der Versuchskammer gehalten, die Kaninchen jeweils einzeln. Bei den Versuchsreihen A, F, G und K wurde der Versuch bis zum Tode der Tiere durchgeführt, der bei einem Teil unter der hohen Sauerstoffspannung in der Kammer eintrat, bei dem anderen Teil nach Versetzen an Außenluft bei bestehender schwerer Dyspnoe. Die Tiere der Versuchsreihe B wurden nach 65 bzw. 75 Stunden Aufenthalt in der Sauerstoffatmosphäre getötet. Die Sektion wurde unmittelbar nach dem Tode durchgeführt, mit Ausnahme von zwei Tieren, deren Tod nicht beobachtet wurde.

Der Sauerstoff wurde von der Flasche über eine Vorlage durch einen Stutzen auf den Boden der Kammer geführt und über eine Öffnung an der Decke der Kammer abgeleitet. In den ausströmenden Sauerstoff wurde die Analysenapparatur eingeschaltet. Analysen wurden nach Bedarf fortlaufend durchgeführt, auch nachts, bis sich die Versuchsbedingungen und damit die Sauerstoffspannung konstant eingestellt hatten, darnach nur noch im Abstand von mehreren Stunden. Die Sauerstoffspannung bewegte sich im allgemeinen zwischen 85 und 95%. Die Temperatur in der Kammer lag zwischen 20 und 23° C. Durch eine Torflage auf dem Boden der Kammer wurde der Urin aufgesogen und dadurch das Auftreten von Ammoniakgeruch vermieden.

Von allen Versuchstieren wurden Lunge, Leber, Herz und Niere histologisch untersucht. Die histologische Methodik war die gleiche wie bei der Versuchsgruppe I. Außerdem wurden die Lungen aller Versuchstiere bakteriologisch untersucht. Dazu wurde von jeder Seite ein Stückchen von Ober- und Unterlappen steril entnommen und durch Ausstrich und Kultur auf Erreger geprüft. Die Besprechung der bakteriologischen Ergebnisse erfolgt in einem besonderen Abschnitt.

In einigen Versuchsreihen wurden laufend Elektrokardiogramme von den Versuchstieren geschrieben. Die elektrokardiographischen Befunde sind von KÜHN bereits ausführlich dargestellt worden.

Versuchsverlauf.

Die klinischen Befunde waren bei allen Versuchstieren gleich und entsprachen durchaus den von Pichotka und Liebegott bei ihren Tieren gemachten Beobachtungen. Es wurde besonderer Wert auf die zeitliche Ordnung der klinischen Symptome gelegt, um eine genaue Zuordnung von klinischen und histologischen Befunden zu ermöglichen.

Alle Tiere zeigten in der ersten Phase des Versuchs (36—48 Stunden) zunächst kaum verändertes Verhalten, dann zunehmende Freßunlust und Bewegungsarmut. Diese konnte anfangs durch Verstärkung des Sauerstoffstromes in das Gegenteil, eine ausgesprochene Hypermotorik, umgewandelt, gegen Ende des Versuches aber nicht mehr beeinflußt werden. Im übrigen bestand anscheinend ein verhältnismäßig ungestörtes Befinden während der 1. Versuchszeit.

Auffallend waren die Symptome von seiten der Atmung. Hier kam es nach einer anfänglichen Frequenzsteigerung nach 24—40 Stunden zu einem Wiederabsinken der Atemfrequenz zum Ausgangswert oder zu darunter liegenden Werten. Auf dieser Höhe hielt sich die Atemfrequenz, bis es im späteren Verlauf mit dem Auftreten von Orthopnoe zu Nasenflügel- und Flankenatmung kam. Die Zahl der Atemzüge stieg dabei bis zu 180 in der Minute und darüber, um kurz vor dem Tode wieder stark abzusinken. Gegen Ende wurden Krampf- und Schnappatmung beobachtet, unter denen der Tod eintrat.

In diesem letzten Stadium war die Atmung schwer und rasselnd. Teilweise machte sich das beginnende Lungenödem im Auftreten von bräunlichem Schaum vor der Schnauze bemerkbar. Bei manchen Tieren konnten schon viele Stunden vor dem Tode bei der Auskultation Rasselgeräusche festgestellt werden, bevor andere Phänomene von seiten der Atmung in Erscheinung traten.

Diese zweite Phase des Versuchsablaufes bot also im Gegensatz zur ersten das Bild einer schweren klinischen Erkrankung. Die Übergänge waren naturgemäß nicht scharf und zeitlich schwer festzulegen. Das erste Zeichen für den Beginn dieser zweiten Phase war meist eine geringe Orthopnoe.

Die histologischen Befunde.

Die histologischen Befunde der Lungen werden nur in Zusammenfassung wiedergegeben, da sie eine Bestätigung schon bekannter Ergebnisse sind. Ebenso werden die Herz- und Nierenbefunde nur kurz erwähnt, da sie für den Nachweis der zur Frage stehenden Veränderungen ungeeignet sind. Der Hauptwert wird auf die Leberbefunde gelegt, da sich die Leber in Bestätigung früherer Erfahrungen als das geeignetste Objekt zum Nachweis selbst kurzfristiger Hypoxämie erwies. Außerdem hatten wir in der vorhergehenden Versuchsgruppe festgestellt, daß die Meerschweinchenleber auch auf die durch hochgespannten Sauerstoff bedingte Hyperoxämie eine einfach abzugrenzende Reaktion zeigt. Die Leberbefunde sind daher am ausführlichsten behandelt und mit den Versuchsdaten und den Lungenbefunden zusammen in einer Übersichtstabelle vereinigt. Die Versuchsdaten müssen aus dieser Tabelle entnommen werden (Tabelle 2).

1. Lunge. Die histologischen Befunde an den Lungen der unter den beschriebenen Versuchsbedingungen verendeten Tiere glichen durchaus den Bildern, die von Pichotka und Liebegott in ihren Arbeiten über die Veränderungen des Lungenparenchyms unter der Einwirkung von konzentriertem Sauerstoff beschrieben worden sind. Auch wir fanden ausgedehnte seröse, fibrinöse und zelluläre Exsudate, die vorwiegend

Tabelle 2. *Histologische Befunde an Leber und Lunge bei Sauerstoffvergiftung unter Gleichdruck* (vgl. Text).

Tier	Versuchszeit (Stunden)	Tod durch	Leber				Lunge		
			Peripher		Zentral		Ödem und Exsudat	Wandverquellungen	
			Vakuolisierung	Verfettung	Vakuolisierung	Verfettung			
B I	65	Nackenschlag	++	+	++	(+)	+	—	1. Gruppe
B II	75	„	+++	+	—	—	+	—	
B III	75	„	++	+	—	(+)	(+)	—	
B IV	65	„	++	+++	++	++	++	+	
F I	113	„	+	++	+	+	+	+	
G I	65	Spontan unter O_2	++	++	+++	—	++	++	2. Gruppe
F IV	68	„	++	(+)	+++	(+)	+++	+	
A IV	73	„	++	+++	++	—	++	++	
A I	87	„	++	++	++	++++	+	++	
G IV	77	Versetzen an Normalluft	++	—	+++	(+)	++	+	3. Gruppe
A II	81	„	+	+++	(+)	—	++	++	
A III	81	„	+	+++	+++	+++	++	++	
F III	90	„	+	—	++++	—	++	+	
F II	92	„	++++	—	+++	—	+	+	
G III	122	„	++	++	+++	(+)	+++	+	

aus gelapptkernigen Leukocyten bestanden. An den Bronchiolen fanden sich Nekrosen der Epithelien, in ihrer Lichtung Pfröpfe aus geronnenem Eiweiß, abgestoßene Epithelien und Detritus. Bei Tieren, die sehr lange im Versuch waren, sahen wir auch Einsprossen von Fibroblasten in solche Pfröpfe, also das Bild der beginnenden Bronchiolitis obliterans. Als besonders charakteristische Befunde konnten auch wir hyaline Veränderungen an den Alveolärwanden und besonders an den Wandungen der Alveolargänge und der Bronchioli resp. beobachten, die sich färberisch wie fibrinoid verdichtetes Eiweiß verhielten. Es handelte sich der charakteristischen Lage und Beschaffenheit nach um grundsätzlich den gleichen Befund, der bei einem Teil der Tiere der ersten Versuchsgruppen erhoben wurde. Die morphologischen Zusammenhänge sind in einer besonderen Abhandlung dargestellt worden. Wir machten dabei die Beobachtung, daß bei den sehr schnell unter den Versuchsbedingungen verendeten oder vorher getöteten Tieren (etwa 60 Stunden) die Veränderungen zum Teil nur sehr gering ausgebildet waren, wobei das Bild der serösen oder sero-fibrinösen Exsudation im Vordergrund stand, während bei Tieren, die lange im Versuch blieben und erst nach 90 oder 120 Stunden starben, die voll ausgebildeten Lungenveränderungen das histologische Bild beherrschten.

2. Herz. An den Herzen der Meerschweinchen fanden sich mit Ausnahme eines Tieres, bei dem ein einzelner Herd mit Strukturverlust der Muskelfasern und wenigen Leukocyten festgestellt wurde, keine pathologischen Veränderungen. Die Gestalt dieses Herdes war nicht typisch für eine hypoxämische Nekrose. Wahrscheinlich hat dieser Herd keine Beziehungen zu den Versuchsbedingungen.

Bei den drei im Versuch verendeten Kaninchen fanden sich dagegen ausgedehnte hypoxämische Nekrosen mit scholligem Zerfall der Msukelfasern, Verlust der Streifung, Kernschwund und Einwucherung von gelapptkernigen Leukocyten und Fibroblasten, also durchweg frische hypoxämische Veränderungen. Diese Herde lagen vorwiegend in der Wand der linken Kammer sowie den der linken Kammer zugewandten Abschnitten des Septums. In der Wand des rechten Ventrikels wurden nur bei einem Tier Nekrosen gefunden und auch hier nur in geringer Ausdehnung. Ältere Veränderungen, also bindegewebige Narben konnten bei keinem Tier beobachtet werden. Diese Veränderungen stehen in voller Übereinstimmung mit den Befunden von Liebegott. Sie sind nach den Untersuchungen von Büchner und Mitarbeitern als Folgezustände nach Hypoxämie bekannt. Die Tatsache, daß nur bei den Kaninchen, nicht dagegen bei den Meerschweinchen derartige Nekrosen beobachtet wurden, wird durch die stärkere Widerstandsfähigkeit des Meerschweinchenherzens gegenüber dem wenig trainierten Herzen des Stallkaninchens erklärt. Offenbar reicht die relativ kurzfristige hypoxämische Phase zur Entwicklung irreversibler Veränderungen beim sehr widerstandsfähigen Meerschweinchenherzen nicht aus.

3. Niere. An der Niere fanden sich keine krankhaften Veränderungen. Die relativ kurzdauernde hypoxämische Phase im Verlauf der Sauerstoffvergiftung scheint zur Entwicklung solcher Veränderungen nicht auszureichen, werden doch auch bei länger dauernden und stärkerem Sauerstoffmangel, z. B. im Verlauf von Unterdruckversuchen, Veränderungen an den Nieren häufig vermißt, und wenn sie vorhanden sind, niemals in solcher Ausdehnung beobachtet, wie an der Leber und am Herzmuskel (Altmann).

4. Leber. Die Leberbefunde sollen an Hand der umstehenden Tabelle besprochen werden (Tabelle 2, S. 351).

In den Lebern aller Versuchstiere treten gegeneinander gut abgegrenzt peripher und zentral im Läppchen gelegene Veränderungen auf. Diese Veränderungen bestehen sowohl in der Peripherie als auch im Zentrum in dem Auftreten von Vakuolen, Fetttropfen und zahlreichen Übergangsformen zwischen Vakuolen und Fetttropfen in den Leberzellen. Das Verhältnis von Vakuolisierung zu Verfettung ist je nach Versuchsverlauf verschieden. Bei relativ kurzer Versuchszeit überwiegt sowohl peripher als auch zentral die Vakuolisierung gegenüber der Verfettung. Bei Spontantod unter Sauerstoffwirkung, also bei der längsten Versuchsdauer, überwiegt häufig in beiden Bezirken die Verfettung.

Neben der vollkommen regelmäßig auftretenden peripheren und zentralen Vakuolisierung und Verfettung finden sich noch andere Veränderungen mit einer größeren oder geringeren Häufigkeit. Sie sind fast ausschließlich peripher lokalisiert. So ist bei fast allen Tieren in der Peripherie der Läppchen und insbesondere in der Umgebung großer Gefäße, sowohl an Ästen der Arteria hepatica als auch der Pfortader, das Auftreten basophiler Epithelien typischer Form und Lokalisation zu beobachten. Diese Zellen sind meist deutlich kleiner als die ihrer Umgebung. Sie haben oft eine lang ausgezogene zipfelige Form und einen pyknotischen Kern. Bei der bildmäßigen Betrachtung hat man den Eindruck, als wenn sie auf die peripheren Gefäßbündel und vor allem die großen Gefäße zuzögen und sich dort vereinigten. In geringer Zahl und meist in wenig ausgeprägter Form finden sich diese Zellen manchmal in den umschriebenen zentralen Vakuolisierungsgebieten.

Ausschließlich in der Peripherie und deutlich sichtbar nur um die großen Gefäße finden sich bei einem kleinen Teil der Tiere Leberzellen, die in Färbung und Struktur vollkommen verblaßt sind. Sie stellen meist die Umrahmung des Gefäßes dar und legen auf Grund ihrer Lokalisation eine Beziehung zu den basophilen Zellen nahe.

Meist in denselben Fällen, in denen sich verblassende Zellen in der Peripherie finden, sieht man auch vom periportalen Bindegewebe ausgehende Fibroblastenwucherungen vollkommen unregelmäßiger Art. In nicht wenigen Fällen tritt in der

Umgebung des peripheren Gefäßbündels ein verschieden großer kernarmer Bezirk in Erscheinung. In diesem Bezirk finden sich in geringer Zahl Bilder des Kernunterganges, häufiger Karyolyse, seltener Karyorhexis.

In einigen wenigen Fällen, die sich meistens durch lange Versuchszeit auszeichneten, trafen wir einen Befund an, den wir bisher noch nicht bei Untersuchungen zu dieser Frage beschrieben fanden. Es handelt sich um die Phagocytose einzelner Leberzellen oder kleiner Leberzellgruppen durch Leukocyten. Die Umgebung dieser Leberzellen erschien meist unverändert und die Phagocytose ein unverständliches Ereignis, das durch keinerlei hinweisende Veränderungen der umliegenden Leberzellen vorbereitet schien.

In der Tabelle sind mit Ausnahme eines Tieres, bei dem besondere Verhältnisse vorlagen, sämtliche Tiere dieser Versuchsgruppe aufgeführt. Die Ergebnisse sind in 3 Gruppen zusammengefaßt. In der 1. Gruppe finden wir die Tiere, die vor dem Eintritt des Spontantodes durch die Sauerstoffvergiftung getötet wurden. Die 2. Gruppe enthält die spontan unter Sauerstoffwirkung gestorbenen Tiere. Als 3. Gruppe sind die Tiere zusammengefaßt, die in verschiedenen klinischen Entwicklungszuständen des Vergiftungsbildes bei dem Versuch, sie an Außenluft zu elektrokardiographieren, zu Tode kamen. Wenn wir diese auf den Versuchsverlauf bezogene zeitliche Einteilung auf den Entwicklungsstand der zu erwartenden histologischen Veränderungen übertragen, so können wir annehmen, in der 1. Gruppe ein relatives Überwiegen der Frühveränderungen zu finden, während die 2. Gruppe wesentlich das ausgeprägte Bild des Endstadiums der histologischen Veränderungen aufzeigen müßte. Die 3. Gruppe ist uncharakteristisch. In ihr finden sich sowohl Tiere mit Veränderungen, die mehr zur 1. Gruppe gehören, als auch solche, die mehr denen der 2. Gruppe entsprechen. Das hat seinen Grund darin, daß die Tiere an verschiedenen Punkten des Vergiftungsablaufes zu Tode gekommen sind. Eine Pneumonose kann auch dann an der Außenluft zu Tode führen, wenn sie unter der erhöhten Sauerstoffspannung des Versuchsraumes noch voll kompensiert ist, und somit noch keine hypoxämischen Veränderungen während des Versuches eingetreten sind. Selbstverständlich kommen an der Außenluft jene Fälle zu Tode, bei denen schon unter erhöhter Sauerstoffspannung Erscheinungen des Sauerstoffmangels zu beobachten waren. In diesem Fall besteht aber die Möglichkeit hypoxämischer Veränderungen, weil während des Aufenthalts im Versuchsraum evtl. schon für längere Zeit eine durch die Pneumonose bedingte Hypoxämie vorlag.

Von den 5 Tieren der 1. Gruppe sind die Tiere B I und B IV trotz der kürzesten Gesamtversuchszeit in einem klinisch schweren Zustand getötet worden. Sie werden daher am wenigsten geeignet sein, die besondere Aufgabe dieser Versuchsgruppe, die Herausstellung von Frühveränderungen, zu erfüllen. Die 3 anderen Tiere sind unter weniger schweren Erscheinungen getötet worden. Bei diesen 3 Tieren (B II, B III, F I) finden wir in der Peripherie eine deutliche bis starke Vakuolisierung und

Verfettung. Im Läppchenzentrum dagegen in 2 Fällen praktisch keine Veränderung und im 3. eine geringe Vakuolisierung und Verfettung. Die peripheren Veränderungen sind deutlich im Übergewicht. Wir können also herausstellen, daß sich im Versuchsverlauf zunächst Veränderungen in der Peripherie, und zwar eine überwiegende Vakuolisierung und eine geringe Verfettung vorfinden. Diese Veränderungen sind bereits entwickelt, bevor ein klinisch bedrohlicher Zustand eintritt.

Die beiden übrigen Tiere dieser Gruppe (B I, B IV), bei denen die Sauerstoffvergiftung bereits bis zu einem klinisch schweren Zustand vorgeschritten war, weisen mit ihren Befunden schon in die Richtung der in der 2. Gruppe darzustellenden Spätveränderungen. Hier tritt in der Leber neben den deutlichen peripheren Veränderungen schon eine ausgedehntere Vakuolisierung und Verfettung des Zentrums auf.

Die 2. Gruppe enthält 4 spontan unter Sauerstoff gestorbene Tiere. Bei diesen Tieren ist also die größtmögliche relative Versuchszeit erreicht. Zumeist bestand vor Eintritt des Todes eine längere Zeit der ausgeprägten klinischen Sauerstoffvergiftung mit Dyspnoe, Orthopnoe und schließlich Schnappatmung.

Wir ersehen aus der Tabelle eine deutliche Zunahme der zentralen Leberveränderungen gegenüber denen in der 1. Gruppe. Die peripheren Veränderungen haben sicherlich keine Zunahme erfahren, so daß bei einem Teil der Tiere bereits ein Überwiegen der zentralen über die peripheren Veränderungen vorliegt. Noch eine andere Verschiebung ist vor sich gegangen. Während in der 1. Gruppe die Vakuolisierung in der Peripherie noch vorherrscht, hat sich hier das Verhältnis zugunsten der Verfettung geändert.

Als Ergebnis der Befunde dieser Gruppe stellen wir fest: Im späteren Verlauf der Sauerstoffvergiftung, offenbar im Stadium der klinisch sichtbaren Störungen, treten Veränderungen im Läppchenzentrum auf, die bei allen Tieren in einer ausgedehnten Vakuolisierung bestehen und bei einem Teil der Tiere darüber hinaus in einer mehr oder minder ausgedehnten Verfettung der Leberepithelien. Gleichzeitig ist an Stelle der in der 1. Gruppe überwiegenden Vakuolisierung der Peripherie eine überwiegende Verfettung derselben getreten.

Die Tiere der 3. Gruppe neigen in ihren Befunden bald mehr der 1., bald mehr der 2. Gruppe zu, offenbar je nachdem in welchem Stadium der Sauerstoffvergiftung das tödliche Versetzen an die Außenluft erfolgte. Für die Auswertung kommen nur die Ergebnisse der 1. und 2. Gruppe in Betracht.

Für die Reihenfolge der Entwicklung der beschriebenen Veränderungen und ihre Zuordnung zum klinischen Bild können wir aus den Ergebnissen der 1. und 2. Gruppe folgenden Schluß ziehen:

In der Leber treten zuerst in den peripheren Zellen Vakuolen auf, die zunehmend in Fetttropfen übergehen. Diese peripheren Veränderungen sind offenbar schon vorhanden, bevor ein klinisch schweres Bild der Sauerstoffvergiftung eintritt und erfahren in späteren Stadien der Vergiftung keine wesentliche Zunahme mehr, sondern nur eine verschieden große Umwandlung der Vakuolen in Fetttropfen. Aus den Ergebnissen der 1. Versuchsgruppe wissen wir, daß diese periphere Vakuolisierung und Verfettung eine Folge der Hyperoxämie sein kann. Es besteht kein Grund, hier eine andere Ursache anzunehmen. Die zentralen Veränderungen der Leber treten erst im Stadium der klinisch schweren Vergiftung auf und erreichen bei spontan unter Sauerstoff gestorbenen Tieren ihre volle Ausbildung. Auch sie beginnen mit einer Vakuolisierung, die im weiteren Verlauf durch eine Verfettung ersetzt wird. Diese Veränderungen sind als Ausdruck einer Hypoxämie bekannt.

In der Leber sind also nacheinander Veränderungen eingetreten, die einmal Ausdruck einer Hyperoxämie sind, zum anderen einer Hypoxämie.

Bezüglich des Zusammenhangs von Leber- und Lungenbefunden läßt sich aus der Tabelle noch folgendes herauslesen: Bei den nach verhältnismäßig kurzer Versuchszeit getöteten oder zu Tode gekommenen Tieren finden sich neben den peripheren Leberveränderungen in der Lunge nur geringgradige Veränderungen, vornehmlich im Sinne eines serösen Exsudats. Bei den Tieren mit langer Versuchszeit, bei denen die zentralen Veränderungen überwiegen, finden sich in der Lunge dagegen ausgedehnte und schwere Veränderungen.

Wir können also im Ablauf der Sauerstoffvergiftung unter Normaldruck zwei verschiedene Phasen feststellen. Zur ersten Phase gehören histologisch relativ unveränderte Lungen, periphere Vakuolisierung und Verfettung in der Leber und klinisch Freßunlust, Schläfrigkeit und verminderte Atemfrequenz. Zur zweiten Phase gehören schwerere Lungenveränderungen, zentrale vakuolige Degeneration der Leber, hypoxämische Veränderungen des Elektrokardiogrammes und klinisch das gesamte Bild der langsamen Erstickung.

Bakteriologische Befunde.

Von vielen Autoren wird die Ansicht vertreten, daß die tödliche Wirkung des Sauerstoffs nur mittelbar sei, indem durch den Sauerstoff eine Schädigung der Lunge herbeigeführt werde, die den Boden für eine bakterielle Entzündung abgebe, und diese bakterielle Entzündung ihrerseits erst die Lungenveränderungen nach sich ziehe und die Todesursache darstelle. Das für alle Formen der bakteriellen Pneumonie völlig atypische histologische Bild der Lungenveränderungen machte eine solche Annahme von vornherein unwahrscheinlich. Trotzdem prüften wir diese Möglichkeit an unserem gesamten Versuchsmaterial mit Ausnahme der akut unter

Tabelle 3.

Tier	Tödliche O_2-Vergiftung bei Normaldruck			
	re. oben	re. unten	li. oben	li. unten
A I	Staphylococcus albus, Gasödem, Coli, Pneumokokken	Staphylococcus albus anhaemol., Streptokokken	Staphylococcus albus, Coli, Gasödem	Staphylococcus albus, Coli
A II	Staphylococcus albus, Gasödem, Coli Pneumokokken	Staphylococcus albus	Coli	steril
A III	Staphylococcus albus, Pneumokokken	Staphylococcus albus	Staphylococcus albus, Pneumokokken	Coli, Pneumokokken
A IV	Staphylococcus albus, Coli	Staphylococcus albus, Col , anhämol. Streptokokken	Staphylococcus albus, anhämol. Streptokokken	anhämol. Streptokokken, Coli, Pneumokokken
B I	Staphylococcus albus	Staphylococcus albus	Staphylococcus albus	Staphylococcus albus
B II	Staphylococcus albus	Staphylococcus albus, Pneumokokken	Staphylococcus albus	Staphylococcus albus
B III	Staphylococcus albus	Staphylococcus albus, Proteus	Staphylococcus albus, Coli	Staphylococcus albus, Coli
B IV	Staphylococcus albus	Staphylococcus albus	Coli	Staphylococcus albus
F I	hämol. Staphylokokken, anhämol. Streptokokken	hämol. Staphylokokken, anhämol. Streptokokken	Staphylokokken, anhämol. Streptokokken, Gasödem	Staphylokokken, anhämol. Streptokokken
F II	Staphylococcus albus, Staphylococcus aureus Pneumokokken	Staphylococcus albus, Staphylococcus aureus, Pneumokokken	Staphylococcus albus	Staphylococcus albus, Pneumokokken
F III	Pneumokokken	Staphylococcus albus, anhämol. Streptokokken	Staphylococcus albus	Staphylococcus albus, anhämol. Streptokokken, Pneumokokken
F IV	Staphylococcus albus, Saprophyten	Staphylococcus albus, Pneumokokken	Staphylococcus albus, anhämol. Streptokokken	Staphylococcus albus, Pneumokokken
G I	Staphylococcus albus et aureus, Streptococcus viridans	Staphylococcus albus et aureus	Staphylococcus albus et aureus	Staphylococcus albus et aureus, Streptococcus viridans
G II	Staphylococcus haemolyticus, Pneumokokken	Staphylococcus albus et aureus, Streptococcus viridans, Pneumokokken	Staphylococcus albus, Streptococcus viridans	Staphylococcus albus

Tabelle 3. (Fortsetzung).

Tier	Tödliche O_2-Vergiftung bei Normaldruck			
	re. oben	re. unten	li. oben	li. unten
G III	Staphylococcus albus	steril	steril	steril
G IV	Staphylococcus aureus mit Hämolyse, anhämolyt. Streptokokken	Staphylokokken, Pneumokokken	Staphylococcus albus	Streptococcus viridans, Pneumokokken

O_2-Überdruck zu Tode gekommenen Tiere*. Unmittelbar nach dem spontan oder künstlich eingetretenen Tode wurde die Brusthöhle steril eröffnet und 4 Stückchen Lunge jeweils vom rechten und linken Ober- und Unterlappen zur bakteriologischen Untersuchung entnommen. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefaßt (Tabelle 3).

Die bakteriologischen Befunde sind in der Tabelle nach Versuchsgruppen zusammengestellt.

Die gefundenen Erreger sind fast alle apathogen. In den wenigen Fällen, in denen pathogene Bakterien gefunden wurden, waren sie in den untersuchten Lungenstücken nur zum Teil und dazu in solch geringer Menge enthalten, daß ein Schluß aus ihrer Anwesenheit auf eine irgendwie ursächliche Bedeutung für den vorliegenden Lungenprozeß vollkommen ungerechtfertigt erscheint, zumal wenn man bedenkt, daß diese Erreger sehr häufig in den Atemwegen gesunder Versuchstiere vorkommen. Diese Auffassung gilt insbesondere für die in einigen Fällen vorgefundenen Pneumokokken. In allen Fällen, in denen wir eine Differenzierung vornahmen, gehörten diese der Gruppe X an; eine weitere Differenzierung war uns nicht möglich. Zieht man dazu in Betracht, daß im Nasenspülwasser von Meerschweinchen bei mehr als 50% der Tiere Pneumokokken gefunden werden, und zwar vom Stamme X 19 (Neufeld und Etinger-Tulzynska), so besteht eine große Wahrscheinlichkeit, daß es sich in unserem Fall um den gleichen Pneumokokkenstamm handelt. Aus der Tatsache, daß trotz der festgestellten Anwesenheit dieser Pneumokokken histologisch und bakteriologisch kein Hinweis auf ihre Beteiligung an dem Lungenprozeß aufzufinden ist, läßt sich der sicherste Beweis für die abakterielle Genese der Lungenveränderungen ziehen. Des weiteren wäre als wichtige Tatsache in diesem Beweis anzuführen, daß bei völlig gleichmäßiger Schädigung der gesamten Lunge der bakterielle Befund in den einzelnen Abschnitten völlig wechselnd ist.

Daß die O_2-Schädigung der Lunge einen Einfluß auf das Bakterienwachstum haben kann in dem Sinne, daß durch eine Resistenzverminderung eine Superinfektion gefördert wird, könnte aus dem Vergleich der Versuchsreihen A und B herausgelesen werden. In der ersten Reihe wurden die Tiere bis zum Tode in der O_2-Atmosphäre gelassen. Hier finden sich in buntem Wechsel hauptsächlich Staphylococcus albus et aureus und Coli. In der Reihe B wurden die Tiere nach Eintritt schwerer klinischer Symptome getötet. Der Vergleich dieser beiden Reihen zeigt, daß gegenüber dem vielfältigen Bild in der Versuchsreihe A in der Versuchsreihe B fast nur Staphylococcus albus in sehr gleichmäßiger Weise vorkommt.

* Für die sorgfältige Durchführung der bakteriologischen Arbeiten sind wir Frl. Christa Herzer zu großem Dank verpflichtet.

Diese Tatsache scheint dafür zu sprechen, daß mit der fortschreitenden klinischen Lungenschädigung eine Zunahme der Bakterien in den betreffenden Lungenabschnitten im Sinne einer Superinfektion durch apathogene Erreger stattfindet.

Mit Sicherheit geht aus den angeführten Ergebnissen hervor, daß die unter erhöhter O_2-Spannung auftretenden Lungenveränderungen unmittelbar durch diese herbeigeführt werden und nicht auf dem Umwege über die Förderung einer bakteriellen Infektion, die ihrerseits die beschriebenen Veränderungen herbeiführt. Damit befinden wir uns in voller Übereinstimmung mit unseren Voruntersuchern in dieser Frage (Karsner, Binger und Mitarbeiter, Pichotka).

Bei der mit grundsätzlich gleichen morphologischen Veränderungen einhergehenden Phosgenvergiftung finden sich anfänglich ebenfalls keine Erreger (Koch, Ricker, Adelheim). Erst vom 3—6. Tag an sieht man das Auftreten zahlreicher Mikroorganismen unter gleichzeitiger Wandlung des histologischen Bildes zur bronchopneumonischen Entzündung. Ebenso betonen Loeschcke und Schultz-Brauns die abakterielle Genese der gleichen Veränderungen bei Vergiftung mit nitrosen Gasen.

Zusammenfassung der Versuchsgruppe II.

1. Meerschweinchen und Kaninchen wurden bis zum Tode oder bis zum Eintritt schwerer klinischer Erscheinungen in einer konzentrierten Sauerstoffatmosphäre bei normalem Gesamtdruck gehalten.

2. Die Tiere gehen in dieser Atmosphäre in einer Zeit von durchschnittlich 70—100 Stunden unter den Zeichen der Asphyxie zugrunde. Die klinischen Angaben früherer Untersucher (Pichotka, Liebegott) werden dabei bestätigt. Im histologischen Bild der Lunge finden sich grundsätzlich die gleichen Elemente wie bei der Sauerstoffvergiftung im Überdruck. Die Veränderungen weisen aber im allgemeinen eine stärkere Ausbildung als in den ersten Versuchsgruppen auf. Vor allem beherrschen hier die hyalinen Bandbildungen an den Wandungen der Alveolen und Alveolargänge das Bild. Sie erreichen bei den Tieren mit den längsten Versuchszeiten den stärksten Grad.

3. Die in früheren Arbeiten als Todesursache angenommene Hypoxämie durch die im Gefolge der Sauerstoffatmung auftretende Pneumonose wird durch morphologische Veränderungen an den Lebern von Meerschweinchen und an den Lebern und Herzen von Kaninchen belegt.

4. Beim Vergleich des klinischen Bildes mit den histologischen Veränderungen von Lungen und Leber ließ sich eine gesetzmäßige *Zweiphasigkeit* feststellen: In der ersten Phase fanden sich bei klinisch fast normalem Verhalten der Tiere in der Lunge nur geringfügige Veränderungen, die allerdings schon in Richtung der in den Spätstadien zu beobachtenden Bilder wiesen und in der Leber *periphere* Veränderungen des Läppchens, wie sie für die Vergiftung bei hohem Sauerstoffüberdruck charakteristisch sind

(s. Teil I *Hyperoxämische Phase*). Im Endstadium dagegen zeigten die Tiere klinisch deutliche Zeichen des Sauerstoffmangels, in der Lunge ausgedehnte Veränderungen und in der Leber außer den peripheren Veränderungen *zentrale* Vakuolisierung und Verfettung, wie sie für die Hypoxämie charakteristisch sind *(Hypoxämische Phase)*.

5. Die bakteriologische Untersuchung der Lungen ergab bei den Tieren, die im Stadium der ausgebildeten Pneumonose getötet worden waren, die Anwesenheit von Staphylococcus albus, während bei den im Versuch verendeten Tieren in der Hauptsache Staphylokokken, Streptokokken und Colibazillen gefunden wurden.

Dieser Befund spricht für eine sekundäre Besiedlung der geschädigten Lunge mit saprophytisch im Nasen-Rachenraum der Versuchstiere lebenden Keimen und gegen eine ursächliche Beteiligung der Bakterien am Zustandekommen der Lungenveränderungen.

III. Besprechung und Deutung der Befunde.

1. Aus unseren in den vorhergehenden Abschnitten dargestellten Versuchen ergibt sich als erstes, daß die von uns verwendeten Tierarten, Meerschweinchen und Kaninchen, in hohen Sauerstoffkonzentrationen zu Tode kommen. Daß es sich bei dieser Beobachtung nicht um ein Einzelergebnis handelt, dafür sprechen zahlreiche Untersuchungen über die Wirkung hochgespannten Sauerstoffes in allen Bereichen des organischen Lebens. (Sauerstoffvergiftung bei Pflanzen: [Bernard, Jost, Kostytschew, Molliard, und andere), bei Bakterien [Karsner und Mitarbeiter, Berghaus, Schlayer u. a.], bei anderen Lebewesen aller Organisationsstufen [v. Buddenbrock, v. Ledebur]).

Diese Wirkung ist nicht nur auf die Organismen als Ganzes beschränkt, sondern sie gilt auch für überlebende Organe und deren Funktion (Bean und Bohr, Bohr und Bean).

Die zunächst eigenartig erscheinende Tatsache, daß der für das Leben unentbehrliche Sauerstoff im Übermaß zum tödlichen Gift wird, verliert alles Befremdende, wenn wir sie unter dem Gesichtspunkt betrachten, der für alle Umweltbedingungen gilt. Es gibt ein optimales Maß für jede der Umweltbedingungen des Organismus. Eine fortschreitende Steigerung oder Herabsetzung der Einwirkung jedes Umweltfaktors führt gleicherweise zur Schädigung.

Für alle höheren Organismen läßt sich unter natürlichen Bedingungen nur die Notwendigkeit des Einhaltens einer *unteren* Sauerstoffgrenzspannung nachweisen. Die *obere* Grenze wird nicht sichtbar, weil die natürlicherweise als höchste vorkommende Spannung von 150 mm Hg das Lebensmedium darstellt. Unter *experimentellen Bedingungen* sind jedoch alle bisher untersuchten Tiere der Wirkung hochgespannten

Sauerstoffs erlegen (Literatur bei Clamann und Becker-Freyseng). Es sind auch keine Ausnahmen von dieser Regel zu erwarten.

Die in unseren Untersuchungen allein interessierende *obere* Grenzspannung des Sauerstoffoptimums ist offenbar für die Tierart und im allgemeinen auch für die Gattung charakteristisch. Für unser Hauptversuchstier, das Meerschweinchen, und für die meisten bisher untersuchten Säuger liegt diese Grenze etwa bei 70—80% einer Atmosphäre. Nur bei Katzen sah Campbell (1927 b) schon bei 40% Sauerstoff klinische Störungen. Für die Ratte, die sich nach den vorliegenden Ergebnissen als am widerstandsfähigsten ausweist,geben Orzechowski und Holste als tödliche Grenzspannung 90—95% Sauerstoff an. Eine reine, d. h. 100%ige Sauerstoffatmosphäre, liegt sicherlich für alle Säugetiere außerhalb des erträglichen Sauerstoffspannungsbereiches.

Nach dem Erreichen der toxischen Grenze der Sauerstoffspannung tritt der Tod in einer für die Art charakteristischen Zeit mit mehr oder weniger großer Streuung ein. Beim weiteren Überschreiten dieser Grenze nimmt die Lebensdauer immer mehr ab, und zwar schneller als es der linearen Spannungszunahme des Sauerstoffsentspricht. Von Hederer und André sind diese Beziehungen für das Kaninchen an ausgedehntem Material in dem Bereich bis zu 12 ata untersucht worden. Wir kommen mit unserem kleinen Material und nur wenigen Meßpunkten für das Meerschweinchen zu grundsätzlich gleichen Ergebnissen. Die Überlebenszeiten für Meerschweinchen sind danach allgemein etwas höher als für Kaninchen und gehen damit bei hohen Sauerstoffdrucken eine größere Widerstandsfähigkeit des Meerschweinchens an. Aus den Ergebnissen von Cleveland ersieht man das grundsätzlich gleiche Verhalten bei Angehörigen anderer Tierklassen.

2. Als weitere Folgerung ergibt sich aus unseren Experimenten, daß der Tod bei der *akuten* Sauerstoffvergiftung unter Sauerstoff*überdruck* und bei der *subakuten* Vergiftung unter *Gleichdruck* nicht in der gleichen Vergiftungsphase und durch die gleichen Veränderungen herbeigeführt wird.

Bei der *subakuten* Vergiftung erfolgt der Tod nach 70—100 Stunden unter dem Bilde der Erstickung. Als *morphologische Befunde*, die diese vorerst aus dem klinischen Bild gefolgerte Annahme unterstützen, sind vor allem die Lungenveränderungen zu nennen, die auf dem Boden einer Kapillarschädigung entstehen (Kühn und Pichotka), und die wir in Übereinstimmung mit früheren Untersuchern (Pichotka, Liebegott) als hemmend für den intrapulmonalen Gasaustausch, also im Sinne einer Pneumonose wirksam ansehen müssen. Als Folge der Hypoxämie, in die der Organismus infolge der Erschwerung des Sauerstoffaustausches in der Lunge kommt, entwickeln sich nach unseren Untersuchungen bei der subakuten Sauerstoffvergiftung unter Gleichdruck in der Leber eine hypoxämische zentrale Verfettung und Vakuolisierung, bei den Kaninchen darüber hinaus

hypoxämische Nekrosen im Herzmuskel. Für das Vorliegen einer Hypoxämie in der zweiten Phase der Vergiftung sprechen auch die Veränderungen des Elektrokardiogramms, die von KÜHN bei sauerstoffvergifteten Meerschweinchen und Kaninchen bei fortgeschrittener Vergiftung, durchschnittlich in den letzten 6 Stunden vor Eintritt des Todes nachgewiesen werden konnten. Sie stimmen mit den bekannten hypoxämischen Veränderungen des Elektrokardiogramms überein. Andere Veränderungen, wie die vergrößerte Kreislaufleistung und die Vermehrung der Erythrocyten und des Hämoglobins in der zweiten Phase der Sauerstoffvergiftung unter Gleichdruck (BINET und Mitarbeiter, ACHARD, BINET und LEBLANC) sind als Kompensationsversuch bei erschwerter Sauerstoffaufnahme zu deuten. Bei Berücksichtigung aller dieser Befunde müssen wir als *Todesursache* bei der subakuten Sauerstoffvergiftung unter Gleichdruck eine *Hypoxämie* im Gefolge der Erschwerung des Gasaustausches in der durch die Sauerstoffwirkung veränderten Lunge annehmen.

Andererseits kann kein Zweifel darüber bestehen, daß zu *Beginn* der Vergiftung der Organismus unter gegensätzlichen Bedingungen steht, nämlich unter denen der Sauerstoffübersättigung, der *Hyperoxämie*. In dieser Phase ist nämlich die Lunge histologisch praktisch unverändert, es muß also bei Erhöhung der alveolaren Sauerstoffspannung nach den Regeln dieser Phase ist nämlich die Lunge histologisch unverändert, es muß also bei Erhöhung der alveolaren Sauerstoffspannung nach den Regeln über die Diffusion des Sauerstoffes im Gewebe (CAMPBELL [1931], PAINE und Mitarbeiter, EBINA, BRIEGER und MÜLLER, FRISCH und SCHNEIDERBAUER) sehr bald zu einer Erhöhung der Sauerstoffspannung im ganzen Körper kommen. Im übrigen ist die Erhöhung der Sauerstoffspannung in Blut und Geweben zu Beginn der Sauerstoffvergiftung auch direkt nachgewiesen worden (CAMPBELL [1931], GESELL).

Wir müssen also annehmen, daß der Organismus bei der Sauerstoffvergiftung unter Gleichdruck eine anfängliche Phase der *Hyperoxämie* durchläuft, um im weiteren Verlaufe der Vergiftung in eine gegensätzliche Phase, nämlich die der *Hypoxämie* zu gelangen, in der schließlich der Tod eintritt. Die Sauerstoffvergiftung unter Gleichdruck ist also in eine *hyperoxämische Anfangs-* und eine *hypoxämische Endphase* zu trennen. Der Vergiftungsablauf ist in einem Schema dargestellt (Abb. 1).

3. Bei der Vergiftung durch Einwirkung konzentrierten Sauerstoffes unter Überdruck liegen nach unseren Untersuchungen offenbar andere Verhältnisse vor. Hier fanden sich — wenigstens bei den unmittelbar im Versuch verendeten Tieren — keine Lungenveränderungen, denen man eine Bedeutung im Sinne einer Erschwerung der Gasdiffusion hätte zuerkennen können. Auch fanden sich an der Leber keine als hypoxämisch zu deutenden Veränderungen. Bei diesen Tieren muß der Tod also vor der Ausbildung einer Hypoxämie eingetreten sein, und zwar nach den obigen

Erörterungen in einer Phase der *Hyperoxämie*, die bei dieser Versuchsanordnung natürlich wesentlich höhere Werte erreicht, als bei der Sauerstoffvergiftung unter Gleichdruck.

Die *morphologischen Veränderungen* sind bei dieser Form der Sauerstoffvergiftung verhältnismäßig geringfügig, offenbar infolge des sehr schnellen Ablaufes der Vergiftung. Das Fehlen pneumonotisch wirksamer Veränderungen an den Lungen unserer Versuchstiere wurde bereits betont.

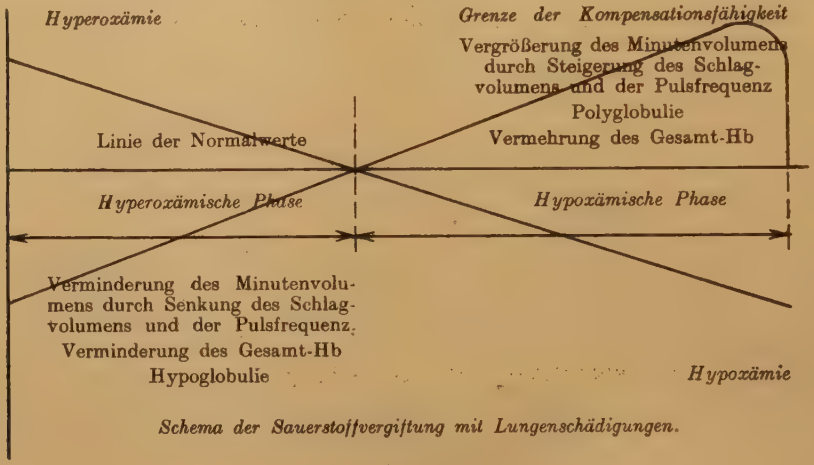


Abb. 1.

Erklärung der Abb. 1. Die Zeichnung stellt den Verlauf der Sauerstoffsättigung des Blutes sowie die als Regulationen aufzufassenden Veränderungen des Kreislaufes und des Blutes schematisch dar. Im Anfang besteht unter den Bedingungen der erhöhten Sauerstoffspannung des Versuchsraumes bei unveränderten Grenzflächen in der Lunge eine *Hyperoxämie*, die der Organismus durch Verminderung der Erythrocytenzahl und der Gesamthämoglobinmenge und durch Verminderung von Schlag- und Minutenvolumen zu kompensieren trachtet. Mit zunehmender Verminderung der Diffusionsfläche durch die sich langsam ausbildende Lungenschädigung nimmt die Sauerstoffspannung des Blutes ab, in gleichem Maße nähern sich die Werte von Kreislauf und Blut der Norm *(hyperoxämische Phase)*. Nach einer gewissen Zeit hat die Diffusionsbehinderung in der Lunge ein solches Ausmaß angenommen, daß trotz der hohen Sauerstoffspannung in der Alveolarluft nur noch eine Sauerstoffsättigung des Blutes erreicht wird, die der Normalspannung entspricht. An diesem Punkt haben sich die Kompensationsvorgänge völlig zurückgebildet. Mit fortschreitender Lungenschädigung kehren sich die Verhältnisse um. Die Gasdiffusion in der Lunge erfährt mit fortschreitender Schädigung dieses Organes eine zunehmende Behinderung, so daß auch bei der hohen alveolaren Sauerstoffspannung eine ausreichende Sättigung des Blutes nicht mehr möglich ist. Der Organismus gerät jetzt also in den Zustand einer fortschreitenden *Hypoxämie*, die er durch Steigerung der Kreislaufleistung und Vermehrung der Erythrocyten und wahrscheinlich auch des Gesamthämoglobins zu kompensieren trachtet *(hypoxämische Phase)*. Bei fortschreitender Lungenschädigung wird schließlich ein Punkt erreicht, an dem eine weitere Kompensation nicht mehr möglich ist. Dann tritt unter Zusammenbruch der Regulationen der Tod ein.

Auch von anderer Seite liegen Beobachtungen in gleicher Richtung vor (Behnke und Mitarbeiter).

Nur bei Tieren, die den Versuch überlebten und nach einiger Zeit an Normalatmosphäre spontan zugrunde gingen, fanden sich ausgedehnte Lungenveränderungen im Sinne der für die Sauerstoffvergiftung unter Gleichdruck typischen Bilder, ein Hinweis darauf, daß die Veränderung der Lunge auch ohne das Fortwirken der Schädigung weiterfortschreitet. Hier liegen Parallelen zu der Phosgenvergiftung vor.

In der Leber fanden sich bei solchen Tieren Vakuolisierungen und Verfettungen in der *Läppchenperipherie*. Diese peripheren Veränderungen möchten wir im Sinne einer toxischen Verfettung (Sachs) und Vakuolisierung durch den Angriff des Sauerstoffes an der Leberzelle deuten. Doch besteht auch die Möglichkeit, daß noch andere Mechanismen hier wirksam werden, insbesondere ist auch an eine Fettmobilisation aus den Fettdepots zu denken. Die periphere Leberverfettung wäre dann als transportative Verfettung aufzufassen. Die nach Beendigung des Versuches an Außenluft spontan verendeten Tiere zeigten in der Leber neben den peripheren auch *zentrale* Veränderungen. Bei ihnen ist es im Gefolge der sich entwickelnden Lungenveränderungen zur Ausbildung einer Hypoxämie gekommen. Sie zeigen also ein grundsätzlich gleiches Verhalten wie die Tiere bei der Sauerstoffvergiftung unter Gleichdruck.

Daß es auch noch an anderen Organsystemen zu morphologischen Veränderungen unter der Einwirkung hochgespannten Sauerstoffes kommt, darauf weisen die von Smith und Mitarbeiter bei länger dauernder fraktionierter Einwirkung hochgespannten Sauerstoffes beobachteten proliferativen und degenerativen Veränderungen an den Arterien und die von Almeida unter den gleichen Bedingungen beschriebenen regressiven Veränderungen an den Hoden von Ratten hin, die diesen Autor zum Vergleich der Sauerstoffwirkung mit der Wirkung von Röntgenstrahlen veranlaßten. Bei länger dauernder fraktionierter Einwirkung hochgespannten Sauerstoffes scheint es also zur Ausbildung stärkerer morphologischer Veränderungen zu kommen.

Bei der von uns untersuchten akut in wenigen Stunden zum Tode führenden Sauerstoffvergiftung unter Überdruck sind die morphologischen Veränderungen auffallend geringfügig. Um so charakteristischer ist das *klinische Bild*. Es wird beherrscht von nervösen Erscheinungen, die in schweren tonisch-klonischen Krämpfen ihren Höhepunkt erreichen. Wie wir uns die Entstehung dieser so ungemein eindrucksvollen Erscheinungen vorzustellen haben, läßt sich auf Grund unserer morphologischen Befunde nicht entscheiden.

4. Überhaupt können wir über den *Wirkungsmechanismus* des hochgespannten Sauerstoffes auf Grund unserer Befunde keine eindeutigen Aussagen machen. Wir müssen in dieser Frage auf physiologische Untersuchungen, besonders der letzten Zeit, verweisen. Die Tatsache der Allgemeingültigkeit der giftigen Wirkung hochgespannten Sauerstoffes, z. B. auch auf einzellige Organismen, deutete auf einen Angriff des Sauerstoffes

an den *Fermentsystemen* hin. Zahlreiche Forscher haben deshalb auch eine Fermentstörung als das entscheidende Ereignis bei der Sauerstoffvergiftung angesehen (Lehmann, Massart und Mitarbeiter, Fahr u. a.). In soeben veröffentlichten Untersuchungen widerspricht Seelkopf dieser Auffassung und sucht die Ergebnisse der Voruntersucher auf methodische Fehler zurückzuführen. Es bleibt abzuwarten, wieweit die Einwände von Seelkopf zu Recht bestehen.

Auch die *Entstehung giftiger Stoffwechselprodukte* ist für den Ablauf der akuten Sauerstoffvergiftung verantwortlich gemacht worden, so bebesonders das Histamin (Mallorny, Orzechowski). Aber schon Paul Bert hat nachgewiesen, daß sich die Wirkung der Sauerstoffvergiftung mit dem Blut vergifteter Tiere nicht auf andere Tiere übertragen läßt, und Campbell (1937) konnte durch Zugabe von Histamin keine Beschleunigung des Vergiftungsablaufes erzielen. Danach ist die Bedeutung des Histamins für die Sauerstoffvergiftung wenig wahrscheinlich.

Eine wichtige Rolle im Vergiftungsablauf scheint die *Kohlensäure* zu spielen. Schon längere Zeit war es bekannt, daß durch Zugabe an sich unwirksamer Kohlensäuremengen die Sauerstoffvergiftung beschleunigt werden kann (Gesell, Hill, Shaw und Mitarbeiter). Ein exakter Nachweis der Steigerung der Kohlensäurespannung in der Peripherie bei der Sauerstoffvergiftung ist durch Messung der Gewebsspannung der Kohlensäure erbracht worden, wobei Werte bis über 200 mm Hg gefunden wurden (Campbell 1925, 1927 a und b, 1929/30, Becker-Freyseng und Pichotka). Die Bedeutung der Kohlensäurestauung für das Zustandekommen der Sauerstoffvergiftung wird auch dadurch besonders deutlich, daß bei Atmung von 25—30% Kohlensäure unter normaler Sauerstoffspannung die gleichen klinischen und morphologischen Veränderungen eintreten, wie bei der akuten Sauerstoffvergiftung (Becker-Freyseng und Pichotka). Diese Beobachtungen scheinen dafür zu sprechen, daß die Erhöhung der Kohlensäurespannung in der Peripherie eines der wichtigsten wirksamen Prinzipien bei der Sauerstoffvergiftung darstellt.

Das Zustandekommen der Kohlensäurestauung wird von diesen Autoren so erklärt, daß bei Erhöhung der alveolären Sauerstoffspannung der chemische Kohlensäuretransport durch den Eingriff des Sauerstoffes in das physikalisch-chemische System des Blutes unterbunden wird. Bei Erhöhung des über die chemische Bindung hinaus physikalisch im Blut gebundenen Sauerstoffes auf einen Betrag, der imstande ist, die gesamte arteriovenöse Differenz zu decken, muß die Reduktion des Oxy-Hb vollständig unterbleiben, da der gesamte Verbrauch aus dem physikalisch gelösten Sauerstoff bestritten wird. Damit bleibt des Plasmaalkali, das unter normalen Verhältnissen zum größten Teil den chemischen Transport der Kohlensäure besorgt, in seiner Bindung. Es steht jetzt also im wesentlichen nur noch der physikalische Transportweg für die Kohlensäure offen, dessen Transportgröße nur von der Spannung abhängig ist. Die anfallende Kohlensäuremenge ist aber zu groß, um bei normaler Spannung abgeführt zu werden. Die Kohlensäurespannung in der Peripherie nimmt unter solchen Bedingungen bis zum Tode fortlaufend zu.

Die Sauerstoffspannung in der Atemluft, bei der dieser Zustand erreicht ist, liegt bei etwa 3,5 ata Sauerstoff. Die physikalisch gelöste Sauerstoffmenge beträgt dann 6—7 ccm je 100 ccm Blut und reicht somit für den gesamten Verbrauch (Gesell). Diese Bedingungen waren in unseren Versuchen immer gegeben.

Der Annahme, daß die Hemmung des Kohlensäuretransportes der *einzige* Schädigungsmechanismus ist, widerspricht jedoch eine von uns und von allen anderen Untersuchern gemachte Erfahrung. Bei einem Sauerstoffdruck von 3—4 ata Sauerstoff (bei dem 6—8 ccm Sauerstoff in 100 ccm Blut echt *gelöst* sind) ist jede Reduktion des Oxy-Hb unterbunden und damit eine vollständige Hemmung des chemischen Kohlensäuretransportes eingetreten. Dieser Effekt ist durch eine weitere Erhöhung der Sauerstoffspannung nicht mehr zu steigern. Trotzdem nimmt die Überlebenszeit mit weiterer Steigerung der Sauerstoffspannung immer weiter ab, soweit die Verhältnisse überhaupt untersucht sind (vgl. das Schema von Hederer und André). Der hochgespannte Sauerstoff muß also noch einen anderen Angriffspunkt im Organismus haben, als die Behinderung des chemischen Kohlensäuretransportes. Dieser Angriffspunkt liegt wahrscheinlich unmittelbar an der Zelle, zu seiner Aufklärung bedarf es weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassung.

Die von uns erhobenen Befunde sind in den Zusammenfassungen der Versuchsgruppen I und II niedergelegt. Zur *Deutung* unserer Befunde ergibt sich folgendes:

1. Unsere Versuche ergeben in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen, daß die Einatmung hoher Sauerstoffkonzentrationen unter Normaldruck und bei Überdruck von einer bestimmten Frist ab tödlich ist.

2. Bei der *subakuten Sauerstoffvergiftung unter Normaldruck* tritt nach unseren Untersuchungen der Tod in einer Phase der *Hypoxämie* ein, die infolge einer Pneumonose durch die histologisch nachgewiesenen Lungenveränderungen zustande kommt und für deren Bestehen die histologischen Veränderungen in der Leber und im Herzmuskel sowie die Veränderungen des Elektrokardiogramms ein Hinweis sind.

3. Bei *akuter Sauerstoffvergiftung im Überdruck* tritt der Tod in einer Phase der *Hyperoxämie* ein. Hypoxämische Veränderungen der Leber und des Herzens sind dabei nicht nachweisbar. Auch bei der subakuten Sauerstoffvergiftung unter Normaldruck wird eine Phase der Hyperoxämie durchlaufen.

4. Die geweblichen Wirkungen der Hyperoxämie sind nach unseren Untersuchungen gering. Lediglich in der Läppchenperipherie der Leber finden sich Verfettungen und Vakuolisierungen, wobei es offen bleibt, ob

diese Veränderungen auf eine direkte Einwirkung des hochgespannten Sauerstoffes auf das Gewebe oder auf indirekte Einflüsse zu beziehen sind.

5. Der Wirkungsmechanismus der Hyperoxämie ist aus unseren Untersuchungen nicht ersichtlich. Die in der Literatur herangezogenen Auswirkungen der Hyperoxämie (Fermentlähmung, Wirkung giftiger Stoffwechselprodukte, Kohlensäurestauung) werden kurz erörtert.

Literatur.

Achard, Ch., L. Binet et A. Leblanc: J. Physiol. et Pathol. gén. **25**, 489 (1927). — Adelheim, R.: Virchows Arch. **236**, 309 (1922); **240**, 417 (1923). — Almeida, de O.: C. r. Soc. Biol. Paris **116**, 1225, 1228 (1934). — Altmann, H. W.: Noch unveröffentlicht. — Bean, J. W. and D. F. Bohr: Amer. J. Physiol. **123**, 11 (1938); **124**, 576 (1938); 130, 445 (1940). — Becker-Freysing, H. u. J. Pichotka: Klin. Wschr. **1944**, 339. — Behnke, A. R., L. A. Shaw, C. W. Shilling, R. M. Thomsen and A. C. Messer: Amer. J. Physiol. **107**, 13 (1934). — Berghaus: Arch. Hyg. (D.) **62**, 172 (1907). — Bernard, Cl.: Lecons sur les effets des substances toxiques. Paris 1883. — Bert, P.: La pression barométrique. Paris 1878. — Binet, L., M. Bochet et A. Giraud: C. r. Soc. Biol. Paris **130**, 1249 (1939). — Binger, Faulkner and Moore: J. exper. Med. **45**, 849 (1927). — Bohr, D. F. and J. W. Bean: Amer. J. Physiol. **131**, 388 (1940). — Brieger, E. u. Müller: Beitr. Klin. Tbk. usw. **74**, 647 (1930). — Buddenbrock, v. W.: Grundriß der vergleichenden Physiologie. Berlin 1924. — Büchner, F.: Die Koronarinsuffizienz (Kreislaufbücherei 3). Dresden 1939. — Campbell, J. A.: J. Physiol. (Brit.) **60**, 20 (1925); **62**, 211 (1927 a); **63**, 325 (1927 b); **68**, 7 (1929/30); **90**, 91 (1937). — Physiol. Rev. **11**, 1 (1931). — Clamann, H. G. u. H. Becker-Freyseng: Luftf.med. **4**, 1 (1940). — Clamann, H. G., H. Becker-Freyseng u. G. Liebegott: Luftf.med. **5**, 17 (1941). — Cleveland: Zit. nach v. Ledebur. — Ebina, T.: Tohoku J. exper. Med. **19**, 335 (1932). — Fahr, E.: Klin. Wschr. **1941 II**, 763. — Frisch, v. A. H. u. A. Schneiderbauer: Beitr. Klin. Tbk. usw. **85**, 256 (1934). — Gesell, R.: Amer. J. Physiol. **66**, 5 (1923). — Hederer, Ch. et L. André: Bull. Acad. Med. Paris III **123**, 294 (1940). — Hill, L.: Quart. J. exper. Physiol. **23**, 49 (1933). — Jost: Pflanzenphysiologie 1904. — Karsner, H. T.: J. exper. Med. **23**, 149 (1916). — Karsner, H. T., H. H. Brittingham and M. L. Richardson: J. Med. Research **44**, 83 (1923/24). — Koch, W.: Handbuch der ärztlichen Erfahrungen im Weltkrieg, S. 526. Berlin 1916. — Kostytschew: Lehrbuch der Pflanzenphysiologie Bd. 1. Berlin: Springer 1926. — Kühn, H. A.: Arch. Kreisl.forsch. **13**, 120 (1943). — Kühn, H. A. u. J. Pichotka: (Im Druck). — Ledebur, v. J.: Erg. Biol. **16**, 173 (1939). — Lehmann, J.: Scand. Arch. Physiol. **72**, 78 (1935). — Liebegott, G.: Beitr. Path. Anat. **105**, 413 (1941). — Loeschcke, H.: Beitr. path. Anat. **49**, 457 (1910). — Mallorny: Noch unveröffentlicht. — Massart, L. and G. v. Grembergen: Arch. intern. Pharmacodyn. **66**, 86 (1941). — Molliard: Zit. nach v. Ledebur. — Neufeld, F. u. R. Etinger-Tulcynska: Z. Hyg. **114**, 324 (1933). — Orzechowski, G.: Noch unveröffentlicht. — Orzechowski, G. u. K. Holste: Arch. exper. Path. **190**, 198 (1932). — Paine, J. R., A. Keys and D. Lynn: Amer. J. Physiol. **133**, 406 (1941). — Pflesser, G.: Arch. exper. Path. **187**, 472 (1937). — Med. Welt **1938 II**, 1600. — Pichotka, J.: Beitr. path. Anat. **105**, 381 (1941). — Prikadlowitzky, S. J.: Z. exper. Med. **99**, 9 (1936). — Ricker, G.: Slg. klin. Vortr. **13**, 226—260 (1919). — Sachs, H. W.: Virchows Arch. **307**, 253 (1941). — Schlayer, C.: J. Bacteriol. **31**, 180 (1936). — Schultz-Brauns, O.: Virchows Arch. **277**, 174 (1930). — Seelkopf, K.: Luftf.med. **9**, 57 (1944). — Smith, Bennet, Heim, Thomson and Drinker: J. exper. Med. **56**, 79 (132).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Weitere Notiz über Benzedrin und Pervitin.

Von

Wolfgang Heubner.

(Eingegangen am 15. Januar 1945.)

Aus den früheren Untersuchungen[1] war hervorgegangen, daß eine Unterscheidung von Benzedrin und Pervitin im Tierversuch an Ratten und Mäusen nicht möglich ist. Inzwischen wurden einige weitere Versuche an jungen Ratten von etwa 50 g Gewicht ausgeführt, die dasselbe unsystematische Bild zeigten wie die früheren (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1. *Je zwei jungen Ratten Benzedrinsulfat (∅ überlebend, + gestorben).*

	Intraperitoneal					Subkutan	
γ/g	102	134	177	236	γ/g	75	102
	∅	∅	+	∅		+	∅
	∅	∅	∅	∅		+	∅

Es schien geboten, zwecks Identifizierung der beiden Basen weitere Kennzeichen auf *chemischem* Gebiete zu suchen, für das wenigstens in der mir zur Zeit zugänglichen Literatur nur sehr dürftige Angaben zu finden sind. Ich stellte daher die Pikrate und Chloroplatinate der beiden Basen her und gebe hier die dabei ermittelten Daten wieder.

Das Benzedrinsulfat wurde dazu in das Chlorid verwandelt, indem die Base aus alkalischer wäßriger Lösung mit Wasserdampf übergetrieben und in etwa der doppelten theoretischen Menge Salzsäure aufgefangen wurde. Das erhaltene Hydrochlorid war äußerst zerfließlich, selbst im Exsiccator über Chlorcalcium. Pervitintabletten des Handels wurden mit Wasser verrührt, der unlösliche Anteil der Tablettenmasse abfiltriert.

Diese Lösung, wie eine wäßrige Lösung von Benzedrinchlorhydrat, wurde mit halbgesättigter Pikrinsäurelösung, sowie 20%iger Lösung von Platinchlorwasserstoffsäure versetzt.

Das Pikrat des Benzedrins schied sich erst nach längerer Zeit, doch gleich in wohlausgebildeten, meist größeren Kristallen, nämlich flachen recht- und stumpfwinkeligen Prismen ab, die nach einmaligem Umkristallisieren bereits den Schmelzpunkt von 87° (unkorr.) hatten, der in weiteren

[1] Naunyn-Schmiedebergs Arch. **202**, 594 (1943).

Kristallisationen unverändert blieb. Das Pikrat der Pervitinbase schied sich in feinen Nädelchen ab, die erst beim Einengen der Mutterlauge reichlicher wurden: Nach dem Waschen und einmaligem Umkristallisieren aus heißem Wasser ergaben sich rechteckige flache prismatische, zum Teil auch spießförmige Kristalle; ihr Schmelzpunkt lag bei 143° (unkorr.).

Das Chloroplatinat des Benzedrins löste sich ziemlich gut in Wasser, ließ sich aber aus wenig heißem Wasser gut umkristallisieren. Dabei schieden sich zunächst *hellgelbe* Nadeln aus, die sich jedoch unter der Mutterlauge im Laufe von Tagen in Drusen derberer *orangeroter* Prismen umwandelten. Im Schmelzpunktröhrchen zersetzte sich die gelbe Modifikation des Chloroplatinats bei etwa 130—135°, die orangerote (auch aus der gleichen Kristallisationsfraktion) im gleichen Bade stets etwa 5° höher. Mir scheint kein Zweifel daran möglich, daß es sich tatsächlich um zwei verschiedene Modifikationen der gleichen Verbindung handelt, die ein Charakteristikum des Benzedrins darstellen dürften. Nach Trocknen bei Zimmertemperatur über Calciumchlorid lieferten zwei Proben des Chloroplatinats von 70,6 und 34,7 mg 20,1 und 9,9 mg Platin, also übereinstimmend 28,5%, während die Theorie für $(C_9H_{14}N)_2 \cdot Pt\,Cl_6$ 28,78% verlangt. Das Chloroplatinat der Pervitinbase war erheblich weniger in Wasser löslich; nach Lösung in der erforderlichen Menge heißen Wassers schied es sich erst nach längerem Stehen in Form eines Filzes feinster Nadeln aus; eine Neigung zur weiteren Umwandlung wurde — wenigstens in gleichen Zeiten wie bei Benzedrin — nicht bemerkt. Nach Waschen und Trocknen bei Zimmertemperatur über Calciumchlorid lieferte eine Probe des Chloroplatinats von 35,7 mg 9,8 mg Platin, also 27,5%, während die Theorie für $(C_{10}H_{16}N)_2 \cdot Pt\,Cl_6$ 27,64% verlangt. Beim Erwärmen im Schmelzpunktröhrchen zersetzte sich das Chloroplatinat zwischen 190 und 195°.

Zusammenfassung.

Die Eigenschaften der Pikrate, wie besonders der Chloroplatinate, sind gut geeignet, Benzedrin und sein N-methylderivat (Pervitinbase) zu charakterisieren und voneinander zu unterscheiden.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Atropin und Adsorbentien in vivo.

Von

Elisabeth Haas.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 25. Januar 1945.)

In Untersuchungen von Schloss[1], Dey und Haar[2] hatte sich ergeben, daß Atropin durch adsorbierende Pulver zerstört werden kann, daß es aber auch vor der Zerstörung schon so fest an ihnen haftet, daß es in vitro nur zum Teil in zehntelnormale Salzsäure übergeht. Dieser Tatbestand warf die Frage auf, wie sich Atropin im lebenden Organismus verhält, wenn es zusammen mit adsorbierenden Pulvern verabreicht wird, was bei der Therapie gestörter Magenfunktion oft genug geschieht.

Die Prüfung dieser Frage wurde an Ratten vorgenommen, weil genau dosierte innerliche Gaben von Pulvern durch die Schlundsonde gegeben werden mußten und dies bei Mäusen undurchführbar war; im übrigen aber wurde zur quantitativen Bestimmung des resorbierten Atropins oder richtiger l-Hyoscyamins die gleiche Methode benutzt, die Pulewka[3] für Mäuse ausgearbeitet und die Schloss, Dey und Haar ebenfalls verwendet hatten: Es wurde also an 34 dunkel gehaltenen männlichen Ratten von 150—300 g Gewicht der Pupillendurchmesser bei seitlicher Beleuchtung mit Binokularlupe und Mikrometer auf Zehntelmillimeter genau bestimmt, und zwar nach Zufuhr von Hyoscyamin in Abständen von 10 Min. bis zur Überschreitung des Maximums. Dies erforderte je nach Dosis und Applikationsweise den Zeitraum von 1—3 Stunden. Die Angaben erfolgten wie in den früheren Arbeiten nicht als absolute Werte, sondern als Quotienten des gerade abgelesenen durch den vorher ermittelten Normalwert des gleichen Individuums.

Diese an sich zweckmäßige Verwertungsweise der gemessenen Zahlen verlangt jedoch eine gewisse Vorsicht. Vor jedem neuen Versuch ist immer abzuwarten, bis die Pupille wieder völlig eng geworden ist, so daß bei der nachhaltigen Wirkung des Atropins am gleichen Individuum in der Woche nur 2 Versuche angestellt werden können. Aber noch eine zweite Vorsichtsmaßregel ist geboten: Wie ich bei den Ratten bemerkt habe, nimmt bei

[1] Schloss: Arch. exper. Path. (D.) **188**, 669 (1938). — [2] Dey u. Haar: Arch. exper. Path. (D.) **203**, 188 (1944). Ferner Hugo Haar: Inaug.-Diss. Berlin 1943. — [3] Pulewka: Arch. exper. Path. (D.) **168**, 307 (1932).

mehrfach verwendeten Tieren die Pupillenweite zu, d. h. auch nach Abklingen der Atropinwirkung bleibt ihr Durchmesser größer als vorher. Infolgedessen wird bei erneuter Auswertung von Atropin der ermittelte Quotient kleiner als sonst bei den gleichen Dosen. Dies ist natürlich bei der Ausnutzung der erzielten Erweiterung der Pupille als *Maß* für die zur Wirkung kommenden *Dosen* sehr sorgfältig im Auge zu behalten, was wiederholte Überprüfung der einzelnen Individuen und Ausmerzung der allzu rasch „gewöhnten" bedingt. Soweit dies geschah, erwies sich die Methode von PULEWKA an Ratten genau so gut brauchbar wie an Mäusen.

Die sicherste Form der Eichung erfolgt durch subcutane Injektion von Atropinlösungen. Die von mir verwendeten Lösungen wurden im Eisschrank aufbewahrt und niemals länger als 14 Tage nach ihrer Herstellung gebraucht. Bei der Prüfung an 24 Tieren fand ich mit Atropindosen entsprechend 12,5, 25, 37,5, 50 γ Hyoscyaminsulfat je Kilogramm im Durchschnitt einen etwa linearen Anstieg des Quotienten bis 7,5, also um 6,5 (vgl. Tabelle 1). Nach den Angaben der obengenannten Autoren berechnet sich für Mäuse auf das gleiche Körpergewicht eine etwa halb so große

Tabelle 1. *Zahlen für die erhaltenen Pupillenquotienten (aus dem maximalen Durchmesser nach und vor der Vergiftung).*

Tier-Nr.	l-Hyoscyaminsulfat γ/kg												
	subkutan				peroral								
	12,5	25	37,5	50	37,5	75	150	300	450	600	750	900	1200
1	1,7	2,8	2,9	6,6	—	1,4	1,6	3,0	4,0	5,2	3,4	5,9	7,9
2	2,3	—	2,8	6,7	1,2	1,2	1,0	2,0	3,3	4,8	5,0	8,2	8,4
3	—	—	—	—	1,1	1,0	1,8	—	4,2	5,7	—	—	—
4	—	—	—	—	1,3	1,3	1,2	1,8	3,6	3,2	4,8	5,7	6,9
5	—	—	—	3,5	—	—	—	3,8	—	—	3,0	7,6	9,6
6	2,6	4,6	4,3	7,5	—	—	—	—	4,8	—	3,9	5,9	10,0
7	2,3	3,8	5,4	6,9	—	—	—	2,7	4,2	—	4,6	5,1	7,5
8	2,5	3,3	4,3	7,5	—	—	—	—	3,2	4,6	3,8	4,9	8,3
9	1,8	3,7	3,8	8,5	—	—	—	2,0	3,5	3,3	3,7	6,6	5,7
10	3,5	3,9	5,7	9,9	—	—	—	3,4	3,9	5,0	4,6	6,4	10,7
11	2,1	—	5,6	—	—	—	—	—	4,2	4,8	5,4	6,7	9,2
12	—	5,8	—	—	—	—	—	2,9	4,0	5,5	—	—	—
13	2,0	—	8,3	8,4	—	—	—	3,3	3,7	5,5	5,3	7,6	8,4
14	3,7	—	7,5	—	—	—	—	2,6	3,7	6,0	7,0	9,0	8,7
15	2,2	—	5,5	—	—	—	—	—	—	—	4,3	4,4	6,5
16	1,1	5,0	6,0	6,0	—	—	—	—	—	4,2	4,2	11,0	9,3
17	2,0	6,3	6,0	9,6	—	—	—	2,3	—	4,8	4,9	9,5	8,9
18	3,0	5,0	7,9	8,6	—	—	—	—	3,2	5,2	4,6	6,3	7,2
19	2,3	4,2	7,9	8,4	—	—	—	—	—	4,8	5,8	4,9	6,1
20	—	6,4	—	—	—	—	—	1,9	2,4	3,9	3,7	—	—
21	1,7	—	7,5	7,5	—	—	—	2,8	—	6,4	5,1	7,0	7,5
22	2,5	6,9	7,0	7,1	—	—	—	2,0	—	5,5	8,0	7,8	8,0
23	2,0	3,0	6,3	7,3	—	—	—	—	4,0	4,7	4,9	6,3	6,9
24	1,5	—	6,0	—	—	—	—	3,7	—	5,8	3,9	6,2	6,8
Durchschnitt	2,3	4,6	5,8	7,5	1,2	1,2	1,4	2,8	3,7	4,9	4,7	6,8	8,0

Empfindlichkeit. Die Empfindlichkeit des Menschen liegt offensichtlich ebenfalls in der gleichen Größenordnung wie bei diesen Nagern.

An dem gleichen Tiermaterial wurde — stets nach 12stündigem Hungern — Atropinsulfat peroral in wäßriger Lösung durch die Schlundsonde gegeben. Dabei war zu berücksichtigen, was bereits seit HECKEL[4] bekannt ist, daß nämlich Ratten wie andere Nager ohne Schaden mit Belladonnablättern gefüttert werden können. Daher zeigte sich auch in meinen Versuchen — in scharfem Kontrast zum Menschen —, daß die innerlichen Dosen gewaltig gesteigert werden mußten, um den gleichen Wirkungsgrad zu erzielen wie subkutan, nämlich auf das 25fache. Dies

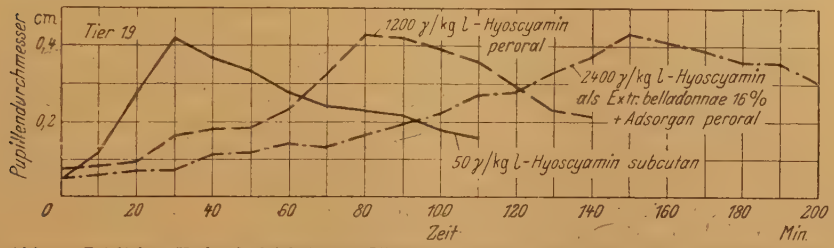


Abb. 1. Zeitlicher Verlauf gleichstarker Wirkung auf die Pupille nach der Applikation von Hyoscyamin auf verschiedene Weise an derselben Ratte.

Verhalten ist kaum anders zu deuten als durch ein beträchtliches Zerstörungsvermögen der aufnehmenden Organe für das Hyoscyamin. In Frage kämen Darmlumen, Darmschleimhaut und Leber. Soweit ich aus der Literatur feststellen konnte, ist für die Ratten bisher nur bekannt, daß Extrakte aus ihrer Leber das Hyoscyamin ziemlich langsam verseifen, nämlich etwa so schnell wie die von Katzen oder Hunden und längst nicht so schnell wie die von Meerschweinchen[5].

Ohne weiteres ist verständlich, daß der Höhepunkt des Effektes an der Pupille bei innerlicher Gabe zeitlich später eintrat als bei subkutaner. Die Abb. 1 gibt den Verlauf der Pupillenweite an ein und demselben Tier bei verschiedener Applikationsweise wieder, wobei das *Ausmaß* der Wirkung etwa das gleiche war. Die erhaltenen Zahlen — ausgedrückt als Quotienten — finden sich ebenfalls auf der Tabelle 1.

Häufiger als Atropin selbst wird in Kombination mit Adsorbentien das Extractum belladonnae angewandt. Daher erschien es erforderlich, im Vergleich zu den innerlichen Gaben von Atropinsalz auch dieses Extrakt zu prüfen. Es wurde ebenfalls als wäßrige Lösung mit der Schlundsonde an 10 Tieren verabreicht. Der Hyoscyamingehalt des Extraktes wurde nach den Angaben von HERZOG-HANNER[6] zu 1,49% bestimmt. Die

[4] HECKEL: C. R. de l'acad. Paris **80**, 1608 (1875). — [5] FREDERICK u. MARY BERNHEIM: J. Pharmacol. (Am.) **64**, 209 (1938). — [6] HERZOG-HANNER: Die chemischen und physikalischen Prüfungsmethoden des Deutschen Arzneibuches. 5. Ausg., S. 208, 1924.

gefundenen Quotienten bringt Tabelle 2. Der Vergleich dieser Zahlen mit denen aus Tabelle 1 läßt erkennen, daß die Resorption und Zerstörung des Hyoscyamins aus dem Extrakt nur sehr geringe Unterschiede gegenüber der Zufuhr des Sulfats aufweist. Im ganzen ist die Wirkung etwas geringer, was wohl auf eine etwas langsamere Resorption hinweist. Der Vergleich des *zeitlichen* Verlaufs ist schwierig, da aus äußeren Gründen die beiden Materialien nicht an denselben Individuen geprüft worden waren.

Tabelle 2. *Zahlen für Pupillenquotienten* (vgl. Tabelle 1).

Tier-Nr.	l-Hyoscyamin γ/kg in Extractum belladonnae peroral			
	300	600	900	1200
25	2,4	2,8	3,2	—
	2,4	2,3	5,0	—
	1,5	—	—	—
26	2,3	2,6	5,9	—
	2,4	2,0	5,0	—
27	4,2	7,1	10,6	—
	3,6	5,0	8,8	—
	3,3	—	—	—
28	1,1	2,4	4,4	—
	2,2	3,8	5,0	—
	1,2	—	—	—
29	2,1	4,7	5,0	—
30	1,3	2,5	5,4	—
31	—	—	—	9,5
	—	—	—	8,9
32	—	—	—	8,5
	—	—	—	6,9
33	—	—	—	7,3
	—	—	—	9,0
34	—	—	—	6,3
	—	—	—	5,8
Durchschnitt	2,3	3,5	5,8	7,8

Nach diesen vorbereitenden Feststellungen konnte nun die eingangs erörterte Frage über den Einfluß von Adsorbentien auf die Wirkung innerlich gegebenen l-Hyoscyamins unter Benutzung von Extractum belladonnae in Angriff genommen werden. Es wurden demgemäß Gemische des gleichen Extraktmusters, das zu den oben beschriebenen Versuchen gedient hatte, mit adsorbierenden Pulvern hergestellt, die unmittelbar nach der Herstellung in einer für jedes Individuum genau abgewogenen Menge mit Wasser aufgerührt und verlustlos unter Nachspülen durch die Schlundsonde in den Magen gespritzt wurden. Das Höchstgewicht an Pulver betrug dabei 300 bis 600 mg, das Gesamtvolumen des wäßrigen Breis mit Spülflüssigkeit maximal 7 ccm; die verwendeten Adsorbentien waren Bolus alba, Magnesia usta, das technische Aluminiumsilikat „Neutralon", sowie das Silikat-Chlorsilber-Kohlegemisch „Adsorgan". Die Ergebnisse finden sich auf Tabelle 3.

Aus den erhaltenen Zahlen geht im Vergleich zu denen der Tabelle 2 deutlich hervor, daß die Gegenwart des adsorbierenden Pulvers die Wirkung des Hyoscyamins auf etwa die Hälfte verminderte. Der zeitliche Verlauf, vor allem im Abklingen der Wirkung (vgl. Abb. 1), sprach dafür, daß es sich nicht nur um eine *verzögerte* Resorption, sondern tatsächlich darum handelt, daß von der gegebenen Menge des Alkaloids nur ein kleinerer Anteil zur Wirkung gelangte. Allerdings ist nicht ganz auszuschließen, daß infolge verzögerter Resorption die bei dem Versuchstier Ratte sehr beträchtliche Zerstörung in den Bauchorganen (vgl. oben S. 371) sich noch stärker geltend macht als sonst; dies wäre dann ein

Tabelle 3. *Zahlen für Pupillenquotienten* (vgl. Tabelle 1).

Tier-Nr.	Bolus alba + Extr. belladonnae 4% Dosis: 1200 γ/kg	Magnesiausta + Extr. belladonnae 4% Dosis: 1200 γ/kg	Adsorgan + Extr. belladonnae 4% Dosis: 1200 γ/kg	Neutralon + Extr. belladonnae 4% Dosis: 2400 γ/kg	Adsorgan + Extr. belladonnae 8% Dosis: 2400 γ/kg	Adsorgan + Extr. belladonnae 16% Dosis: 2400 γ/kg
1	3,8	4,1	—	10,4	7,0	9,4
2	2,5	5,5	1,6	12,0	6,3	8,6
3	3,4	4,9	—	8,7	8,2	7,5
4	3,3	4,5	2,0	9,4	6,4	8,1
5	4,2	—	3,1	6,8	5,8	7,4
6	3,8	6,2	1,6	14,7	6,9	7,2
7	2,9	4,5	2,4	9,4	7,5	7,8
8	4,0	5,0	4,2	12,5	7,0	8,1
9	5,0	4,8	2,0	11,3	6,9	7,3
10	5,3	4,1	3,0	9,5	6,2	7,9
11	6,1	5,3	—	13,6	—	10,3
13	3,7	6,1	2,1	13,7	6,2	6,9
14	3,5	4,3	2,7	—	8,9	9,5
15	3,9	3,9	3,5	—	5,9	6,8
16	4,0	5,1	2,1	9,8	7,1	7,2
17	3,5	4,9	2,8	11,2	6,3	7,3
18	3,3	4,7	2,5	10,4	6,5	6,3
19	4,1	—	2,9	12,9	6,1	8,6
21	3,8	5,2	1,8	13,1	7,2	9,2
22	4,0	4,5	3,3	9,5	6,8	9,0
23	3,9	5,2	4,5	9,2	7,2	7,5
24	4,5	4,8	3,8	9,1	6,9	7,3
Durchschnitt	3,9	4,9	2,7	10,9	6,9	7,9

Faktor, der für die Übertragung auf die menschliche Therapie eine gewisse Einschränkung bedeuten könnte. Auf der anderen Seite ist jedoch zu bedenken, daß eben wegen der hohen Zerstörung durch diese Organe der Anteil an Belladonnaextrakt in den Pulvergemischen viel höher gewählt werden mußte, als es in der menschlichen Therapie üblich ist. Dadurch wird nach bekannten Gesetzen die Wirksamkeit der adsorbierenden Kraft der Pulverteilchen erheblich zurückgedrängt; diese muß sich also bei den in der Therapie gebrauchten Gemischen wesentlich stärker bemerkbar machen. Daß dies tatsächlich auch im Magen- und Darmlumen des lebenden Organismus zutrifft, dafür scheint mir ein Argument der Vergleich der zwei letzten Versuchsreihen mit der gleichen Menge Belladonnaextrakt, aber verschiecenen Mengen Adsorgan zu sein: Dessen Erhöhung auf das Doppelte senkte den Quotienten der Pupillenerweiterung in 12 von 21 Versuchen um mehr als 0,5 und im Gesamtdurchschnitt um 1, während nur zweimal eine geringe Erhöhung (um 0,2 und 0,7) auftrat.

Die Versuche dürften also in überzeugender Weise bestätigen, was die früheren Beobachtungen in vitro erwiesen hatten, daß nämlich Atropin bei Gegenwart von Adsorbentien partiell unwirksam gemacht wird, nicht

nur beim Lagern fertiger Spezialitäten, sondern auch bei Gebrauch frisch hergestellter Pulvermischungen. Diese so beliebte Therapie kann also nicht als zweckmäßig angesehen werden. Mindestens bedeutet sie ein verschwenderisches Umgehen mit einem der wertvollsten Heilmittel.

Zusammenfassung.

1. Die an der Pupille wirksame Atropindosis liegt bei Ratten um etwa die Hälfte niedriger als bei Mäusen, eine mittelstarke Mydriasis erfordert je kg etwa 0,05 mg Atropinsulfat, was für 70 kg 3—4 mg entspricht. Die Unterschiede der Empfindlichkeit sind also bei subcutaner Gabe für Ratte, Maus und Mensch nur gering.

2. Bei oraler Gabe ist an der Ratte die gleiche Wirkung erst bei einer etwa 25mal höheren Dosierung zu erzielen. Extractum belladonnae wirkt in Bezug auf die gleiche Hyoscyaminmenge bei innerlicher Gabe nahezu wie Atropinsulfat.

3. Orale Gaben von Belladonnaextrakt im Gemisch mit adsorbierenden Pulvern sind an der Rattenpupille nur etwa halb so wirksam wie ohne diese Pulver.

4. Die vielgeübte Kombination von Belladonnaextrakt mit adsorbierenden Pulvern erscheint wenig zweckmäßig, mindestens verschwenderisch.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Über den Alkaloidgehalt alkalischer Magenmittel.

Von

W. Heubner und Elisabeth Haas.

(Eingegangen am 15. April 1946.)

Im Januar 1945 erhielten wir aus Heeresbeständen zwei Proben „alkalischen Magenmittels" in Tablettenform, von denen die eine (I) als „gelagert", die zweite (II) als „neu" bezeichnet war. Als Inhalt jeder Tablette zu 1,0 g war angegeben (Tabelle 1):

Tabelle 1.

	Bei I	Bei II
Extractum Belladonnae .	0,01	0,01
Bismutum subnitricum .	0,1	0,3
Magnesia usta	0,4	0,3
Natrium bicarbonicum . .	0,4	0,3

Nach unseren Erfahrungen[1] war bei der Kombination von Hyoscyamin auch in Form des Extractum Belladonnae, mit dem Adsorbens Bismutum subnitricum, und erst recht mit der stark alkalischen Magnesia usta zu vermuten, daß wesentliche Mengen des Alkaloids unwirksam gemacht waren.

Die Prüfung dieser Frage geschah in folgender Weise: Die Tabletten wurden nach den Vorschriften des Deutschen Arzneibuchs VI zur Bestimmung des Alkaloidgehaltes in den Folia Belladonnae extrahiert. Die erhaltenen Extrakte wurden in einer Wassermenge gelöst, die $^3/_8$ des Gewichtes der extrahierten Tablette betrug. Dadurch wären bei Annahme des vorschriftsmäßigen Hyoscyamingehaltes in dem verwendeten Belladonnaextrakt (von 1,5%)

Tabelle 2. *Prüfung von „alkalischem Magenmittel" aus Heeresbeständen auf ihren Gehalt an wirksamem Hyoscyamin an der Rattenpupille.*

l-Hyoscyamin (berechnet) aus:	mg/kg	Quotient maximaler zum normalen Pupillendurchmesser
Atropinum sulfuricum	0,3	2,5
	0,6	4,8
	0,9	6,2
	1,2	8,3
Magenmittel I . . .	1,2	1,1
	2,4	1,3
	4,8	2,4
	9,6	5,0
Magenmittel II . . .	4,8	2,8
	9,6	6,4

[1] Schloss: Naunyn-Schmiedebergs Arch. 188, 669 (1938). — Dey u. Haar: Naunyn-Schmiedebergs Arch. 203, 188 (1944). — Haas, E.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. dieser Band, S. 369.

Lösungen gewonnen worden, die 0,04% Hyoscyamin enthielten. Von jeder der beiden Tablettenarten wurden zweimal solche Lösungen hergestellt und auf wirksames Hyoscyamin untersucht.

Dies erfolgte durch biologische Austestung an 4 männlichen Ratten nach der von uns vielfach erprobten Methode von Pulewka, bei der die maximale Pupillenerweiterung der behandelten Tiere gemessen und als Verhältnis (Quotient) zu der normalen Pupillenweite ausgedrückt wird. Jedes Tier war vorher mit Atropin sulfuricum „geeicht", also die individuelle Dosiswirkungskurve aufgenommen. Die Applikation erfolgte in allen Fällen innerlich; aus früheren Versuchen (Haas, a. a. O.) war bekannt, daß auch bei dieser Applikation die Dosiswirkungskurve für entsprechende Dosen Atropinsulfat und Extractum Belladonnae keinen wesentlichen Unterschied aufweist.

Bei der Austestung der zwei Extrakte aus jedem der beiden Präparate ergab sich eine sehr gute Übereinstimmung der erhaltenen Mittelwerte. Die endgültig erhaltenen Zahlen finden sich auf der Tabelle 2 verzeichnet. Bei ihrer graphischen Interpolation erhält man das Ergebnis, daß das Magenmittel I nur etwa den 15., das Magenmittel II den 12. Teil des Wirkungswertes zeigt, der ihm nach seiner Zusammensetzung zukommen sollte. Somit hat sich die Erwartung voll bestätigt, daß weitaus der größte Teil (14/15 und 11/12) des zugefügten Belladonnaextraktes unwirksam gemacht worden war. Die Präparate dürften bei Weglassung jedes Zusatzes von Belladonnaextrakt therapeutisch kaum anders wirken als in ihrer bisherigen Form. Bei der heutigen Lage auf dem Arzneimittelmarkt muß ein solcher Zusatz als *Verschwendung* gekennzeichnet werden.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Das Verhalten des leicht abspaltbaren Bluteisens bei der Kohlenoxydvergiftung.

Von

Klaus Blömer und Manfred Kiese.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. März 1945.)

Das leicht abspaltbare Bluteisen (l. a. Eisen), das ist das Eisen, das durch 0,1 n-Salzsäure bei 37° während 16—24 Stunden aus Blut in verdünnter Lösung abgespalten wird, ist bisher noch nicht mit Sicherheit in seiner Herkunft und biologischen Bedeutung erkannt worden. Barkan[1], der neben Lintzel[2] zuerst die Aufmerksamkeit darauf lenkte und eine Reihe von Untersuchungen über dieses Eisen anstellte, kam schließlich zu der Auffassung, daß es sich um das einer besonderen Verbindung gehörige Eisen handele. Als diese Verbindung nahm er das Verdoglobin (Barkans Pseudohämoglobin), an[3]. Barkans Beobachtungen, daß das Eisen aus Verdoglobinen durch 0,1 n-Salzsäure leichter abgespalten wird als aus Hämoglobin, wurde von anderen Untersuchern bestätigt[4, 5, 6], doch wird auch aus den Verdoglobinen nur ein Teil des Eisens, nämlich 30—60% abgespalten. Bestimmungen des Verdoglobingehaltes des Blutes[5, 6] ergaben, daß nur ein kleiner Teil des l. a. Eisens aus Verdoglobinen stammen kann. Andererseits haben andere Autoren aus Untersuchungen über das l. a. Eisen den Schluß gezogen, daß es sich bei dem l. a. Eisen um ein Kunstprodukt, um eine Abspaltung eines kleinen Teils des Eisens aus dem Hämoglobin handeln müsse. Auch unsere Untersuchungen über Verdoglobine, die diese Blutfarbstoffderivate als wesentliche Muttersubstanzen des l. a. Eisens ausschlossen, legten diese Annahme nahe. Ihr standen jedoch wichtige Beobachtungen Barkans[7] über die Hemmung der Eisenabspaltung durch Kohlenoxyd entgegen. Die Abspaltung des Eisens aus Blut mit 0,1 n-Salzsäure konnte zum Teil durch Kohlenoxyd gehemmt werden. Nach einer Kohlenoxydvergiftung eines Säugetieres wurde noch Stunden und Tage, nachdem kein Kohlenoxydhämoglobin

[1] Barkan, G.: Z. physiol. Chem. **148**, 124 (1925). — [2] Lintzel, W.: Z. Biol. **83**, 289 (1925). — [3] Barkan, G. u. O. Schales: Z. physiol. Chem. **248**, 96 (1934). — [4] Legge, J. W. u. R. Lemberg: Biochem. J. **35**, 353 (1941). — [5] Kiese, M.: Klin. Wschr. **1942 I**, 565. — [6] Kiese, M. u. L. Seipelt: Arch. exper. Path. (D.) **200**, 648 (1943). — [7] Barkan, G. u. E. Berger: Arch. exper. Path. (D.) **136**, 278 (1928).

mehr im Blute existierte, eine Verminderung des l. a. Eisens im Blute gefunden. SCHWARZ und DECHERT[8] sowie BECKMANN[8a] machten eine Reihe von Bestimmungen des l. a. Eisens nach Kohlenoxydvergiftung und sahen in ihren Ergebnissen eine Bestätigung der Angaben BARKANS. Diese Beobachtung war freilich nicht mit der Annahme einer Abspaltung des l. a. Eisens aus Hämoglobin vereinbar. Somit war nach dem derzeitigen Stande weder Verdoglobin noch Hämoglobin die Muttersubstanz des l. a. Eisens, sondern eine Verbindung, deren einzige weiter bekannte Eigenschaft war, daß sie noch längere Zeit nach einer Kohlenoxydvergiftung im Blute vermindert war. Für eine weitere Klärung der Natur des l. a. Eisens erschien uns das Verhalten des l. a. Eisens bei der Kohlenoxydvergiftung als ein wichtiger Ausgangspunkt.

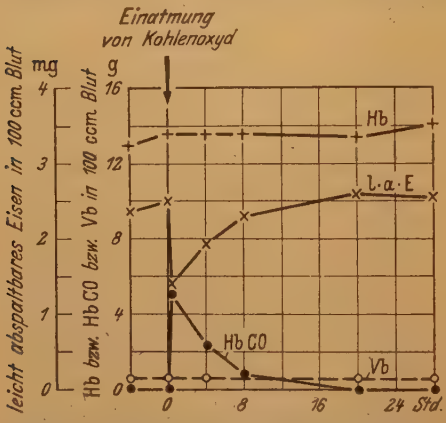


Abb. 1. Änderung der Konzentration des leicht abspaltbaren Bluteisens und des Kohlenoxydhämoglobins nach kurzer Einatmung von reinem Kohlenoxyd. Hund 15,7 kg.

BARKANS Beobachtung über das l. a. Eisen bei der Kohlenoxydvergiftung war über die Bedeutung für die Aufklärung des l. a. Eisens auch für die Kohlenoxydvergiftung von großem Interesse. Zahlreiche experimentelle Untersuchungen über die Kohlenoxydvergiftung führten zu dem Ergebnis, daß die Wirkung des Kohlenoxyds mit der Bildung von Kohlenoxydhämoglobin, die zu einer Anoxie des Organismus führt, erschöpft ist. BARKANS Angaben über Verminderung des l. a. Eisens noch lange Zeit nach Ausscheidung des Kohlenoxyds waren ein wichtiger Hinweis auf die Möglichkeit einer chronischen Kohlenoxydvergiftung, die auf Grund der früheren Kenntnisse über die Wirkung des Kohlenoxyds nicht angenommen werden konnte.

Unsere Versuche über die Änderung des l. a. Eisen während und nach der Kohlenoxydvergiftung beim Hunde führten zu einem ganz eindeutigen Ergebnis, das unsere auf Grund von BARKANS Untersuchungen gemachten Voraussetzungen als unzutreffend erwies. In 12 Versuchen an 4 Hunden nahm übereinstimmend sogleich mit Beginn der Kohlenoxydvergiftung der Gehalt des Blutes an l. a. Eisen ab. Entsprechend der Ausscheidung des Kohlenoxyds nahm jedoch die Konzentration des l. a. Eisens wieder zu und 24 Stunden nach Beendigung der Kohlenoxydeinatmung war sie wieder auf normalen Werten (Abb. 1). Kurz dauernde Einatmung von reinem Kohlenoxyd, die nach wenigen Atemzügen zu Bewußtlosigkeit

[8] SCHWARZ, L. u. W. DECHERT: Klin. Wschr. **1935 I**, 601. — [8a] BECKMANN, H. A.: Z. exper. Med. **109**, 467 (1941).

und Krämpfen führte, hatte die gleiche Wirkung auf Abnahme und Wiederanstieg des l. a. Eisen wie eine lang dauernde Einatmung einer niedrigen Konzentration (Abb. 2). Der Verdoglobingehalt des Blutes änderte sich während der Kohlenoxydvergiftung nicht. Eine Verminderung des l. a. Eisens war nach der Ausscheidung des Kohlenoxyds also nicht mehr vorhanden. Damit entfällt die wesentliche Stütze für die Annahme, daß das l. a. Eisen, insbesondere der durch Kohlenoxyd hemmbare Teil, eine besondere Verbindung wäre. Unsere Ergebnisse entsprechen den Feststellungen von LEGGE und LEMBERG[4], die nach Einleiten von Kohlenoxyd in das Blut in vitro ebenfalls eine Verminderung des l. a. Eisens beobachteten. Doch verschwand die Hemmung der Eisenabspaltung in dem Maße wie der Gehalt des Blutes an Kohlenoxydhämoglobin durch Durchlüftung vermindert wurde.

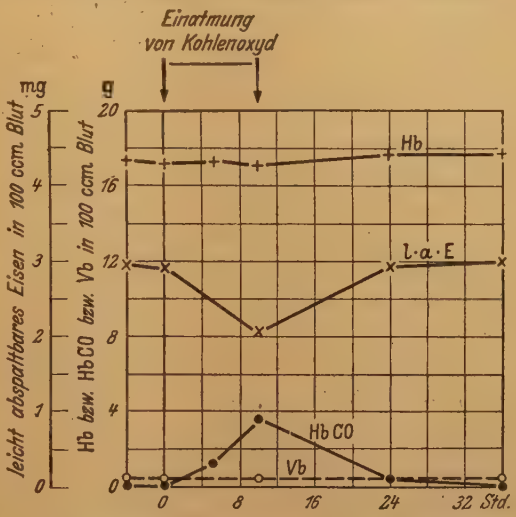


Abb. 2. Änderung der Konzentration des leicht abspaltbaren Bluteisens (l. a. E.) und des Kohlenoxydhämoglobins während und nachlang dauernder Einatmung von Luft mit 0,1—0,3% Kohlenoxyd. Hund 21 kg.

Nachdem eine Charakterisierung des durch Kohlenoxyd hemmbaren l. a. Eisens nicht möglich ist, wird die bereits von anderen Autoren, zuletzt von MILLER und HAHN[9], geäußerte Vermutung, daß diese Fraktion ein Kunstprodukt darstelle, noch wahrscheinlicher. Welche Faktoren gerade einen so kleinen Teil des Hämoglobineisens unter den von BARKAN angegebenen Bedingungen zur Abspaltung bestimmen, ist noch nicht zu übersehen. Auffällig ist, daß das abgespaltene Eisen in zweiwertiger Form vorliegt, während das Eisen im Hämoglobin nach Zusatz von Säure zur Lösung des Blutes schnell oxydiert wird.

Versuche.

A. Methoden.

Die *Bestimmung des l. a. Eisens* wurde nach den Angaben von BARKAN und WALKER[10] durchgeführt, indem 2 ccm Blut in 8 ccm Wasser hämolysiert, mit 5 ccm 1,2%iger Salzsäure versetzt und 17—20 Stunden bei 37° gehalten wurden. Die Lösung wurde dann mit 5 ccm Trichloressigsäure

[9] MILLER, L. L. u. P. P. HAHN: J. biol. Chem. (Am.) **134**, 585 (1940). — [10] BARKAN, G. u. B. S. WALKER: J. biol. Chem. (Am.) **135**, 1 (1940).

enteiweißt und im Filtrat das Eisen als Eisen-Phenanthrolin- oder Eisen-Dipyridylverbindung photometrisch bestimmt. Dabei wurde die Extinktion der Eisen-Phenanthrolinlösung bzw. Eisen-Dipyridyllösung im grünen Gebiet gemessen mit Licht, das durch die Schott-Filter GG 11 und BG 7 von je 1,5 mm Stärke aus Glühlicht erhalten wurde. Photometrische Messungen wurden ausschließlich im Photometer von Havemann[11] durchgeführt. Wir geben die Konzentration des l. a. Eisens in Milligrammprozent an, d. h. Milligramm l. a. Eisen in 100 ccm Blut.

Bei der Bestimmung des im Trichloressigsäurefiltrat vorhandenen abgespaltenen Eisens beobachteten wir eine Abweichung vom Verhalten der Eisenphenanthrolinverbindung bei Eisenbestimmungen in anderen Lösungen. Die charakteristische Farbe des Eisenkomplexes entwickelte sich nach Zusatz von Phenanthrolin zu der mit Sulfit reduzierten Lösung vom p_H 4,5 schnell, erreichte aber nicht wie sonst nach längstens 30 Min. eine konstante Extinktion, vielmehr nahm diese im Laufe von Stunden noch langsam weiter zu und erreichte bei Zimmertemperatur erst nach 36—48 Stunden einen konstanten Wert, der etwa 20—50% höher war als der nach einer Stunde gemessene. Die Einstellung des Endwertes konnte durch Erhöhung der Temperatur beschleunigt werden. Bei 60° wurde der Höchstwert der Extinktion in 24 Stunden erreicht. Wurde das Trichloressigsäurefiltrat eingetrocknet und verbrannt, so wurde bei der Eisenbestimmung in der Asche schnell ein Eisenphenanthrolinkomplex von konstanter Extinktion gebildet. Diese entsprach etwa der Extinktion der nicht veraschten Lösungen nach einer Stunde. Demnach beruhte die Zunahme der Extinktion nicht auf einer Abspaltung von Eisen aus einer Verbindung, in der es nicht mit Phenanthrolin reagieren kann, sondern es wurde allmählich ein Komplex von stärkerer Extinktion gebildet. In

Tabelle 1. *Vergleich der photometrischen Bestimmung des leicht abspaltbaren Bluteisens als Eisenphenanthrolin am nicht veraschten und am veraschten Trichloressigsäurefiltrat.* Hund von 16,2 kg atmete reines Kohlenoxyd bis zum Eintritt von Krämpfen. Unmittelbar danach 6 g Kohlenoxydhämoglobin und 14,2 g Gesamthämoglobin in 100 ccm Blut. Angegeben ist die aus den Extinktionsmessungen errechnete Eisenkonzentration.

Blutentnahme	*Nicht verascht. Trichloressigsäurefiltrat* Messung der Extinktion des Eisenphenanthrolins nach		*Verascht. Trichloressigsäurefiltrat* Messung der Extinktion des Eisenphenanthrolins nach	
	1 Std. mg-%	24 Std. mg-%	1 Std. mg-%	24 Std. mg-%
8^{15}	3,2	3,8	3,0	3,0
9^{15}		Kohlenoxydvergiftung		
9^{30}	1,2	1,6	1,1	1,1
12^{30}	1,8	2,3	1,6	1,6
17^{00}	2,8	3,2	2,8	2,8

[11] Havemann, R.: Biochem. Z. **301**, 105 (1939); **306**, 224 (1940).

Tabelle 1 sind die Eisenbestimmungen eines Versuches zum Vergleich der Ergebnisse der Messung unter den verschiedenen Bedingungen wiedergegeben. Da die aus der Extinktion der Lösungen nach einer Stunde ermittelten Eisenkonzentrationen verhältnismäßig stark streuten und die nach 24 Stunden bestimmten Werte sicher zu hoch waren, stützten wir unsere Schlüsse im wesentlichen auf die Bestimmungen des Eisens im veraschten Trichloressigsäurefiltrat *.

Der Gehalt des Blutes an Hämoglobin wurde als Hämiglobin durch dessen Überführung in Hämiglobincyanid nach EVELYN[12] und HAVEMANN[13] photometrisch bestimmt. Verdoglobin im Blute wurde nach dem Verfahren von KIESE[5] gemessen. Die Konzentration des Hämoglobins sowie des Verdoglobins und Kohlenoxydhämoglobins ist in Prozent angegeben, d. h. Gramm Hämoglobin in 100 ccm Blut.

Die Konzentration des *Kohlenoxydhämoglobins* wurde teils nach dem Verfahren von HAVEMANN[14], teils nach dem von HARTMANN[15] bestimmt. Bei dem Verfahren von HAVEMANN bestimmten wir die Konzentration an Gesamthämoglobin als Hämiglobin wiederum nicht durch direkte Messung der Extinktion des Hämiglobins, sondern indirekt durch Überführung des Hämiglobins in Hämiglobincyanid[5].

HARTMANN bestimmt den Anteil des Kohlenoxydhämoglobins aus dem Verhältnis der Extinktion bei 577—79 mμ (gelbe Hg-Linien) und 546 mμ (grüne Hg-Linien).

Für die Extinktionsmessungen im Photometer wurden die gelben Quecksilberlinien mit Schott-Filtern OG 2 und VG 3 und die grüne Linie mit Filter OG 1 + VG 9 + BG 20 herausgefiltert. Filter BG 20 war 5 mm, die anderen 1,5 mm stark. Um für die direkten Extinktionsmessungen klare Blutlösungen zu erhalten und durch feste Bindung an das Hämoglobin Verluste von Kohlenoxyd möglichst zu vermeiden, wurde die Blutprobe in verdünnter Carbonatlösung hämolysiert, und zwar wurden 0,2 ccm Blut mit einer Carbonatlösung von 0,1% auf 100 ccm verdünnt. Die Extinktionsmessung erfolgte in 30 mm Schichtdicke.

Als Versuchstiere dienten ausschließlich Hunde. Diese atmeten zur Kohlenoxydvergiftung durch eine Maske aus einer Gummiblase reines Kohlenoxyd bis Krämpfe eintraten. Zur lang dauernden Einatmung

* Anmerkung bei der Korrektur: BLÖMER hat inzwischen an anderer Stelle (Pharmazie **1**,7 (1946) einen Teil unserer Versuche veröffentlicht. Er zieht lediglich unsere ersten Untersuchungen heran, bei denen die Extinktion des Eisenphenanthrolins im Trichloressigsäurefiltrat durch 24stündige Erwärmung auf 60° zu maximaler Intensität gebracht worden war. Die dort mitgeteilten Werte für das l. a. Eisen sind also durchgängig 20—50% zu hoch.

[12] EVELYN, K. A. u. H. T. MALLOY: J. biol. Chem. (Am.) **126**, 655 (1938). — [13] HAVEMANN, R., F. JUNG u. B. v. ISSEKUTZ jun.: Biochem. Z. **301**, 116 (1939). — [14] HAVEMANN, R.: Klin. Wschr. **1940 II**, 1183. — [15] HARTMANN, H.: Erg. Physiol. **39**, 413 (1937).

niedriger Kohlenoxydkonzentration wurden die Hunde in eine Gaskammer von 8 cbm gebracht, und diese mit Kohlenoxyd bis zu einer Konzentration von etwa 0,1% gefüllt. In Abständen von mehreren Stunden wurde die Kohlenoxydkonzentration durch Nachfüllung der gleichen Kohlenoxydmenge langsam erhöht.

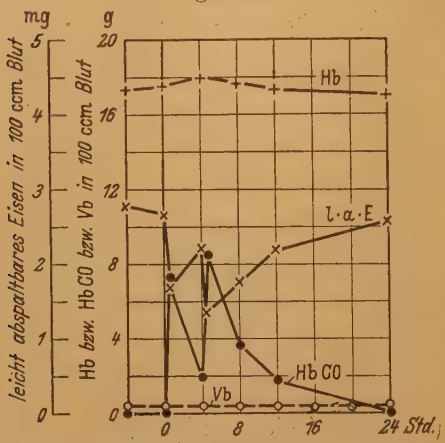


Abb. 3. Änderung der Konzentration des leicht abspaltbaren Bluteisens (l. a. E.) und des Kohlenoxydhämoglobins nach zweimaliger, kurz aufeinander folgender Einatmung von reinem Kohlenoxyd. Hund 18 kg.

B. Ergebnisse.

1. Kurz dauernde Einatmung von reinem Kohlenoxyd.

In den meisten Versuchen wurde die Einatmung von reinem Kohlenoxyd so lange fortgesetzt, bis die Tiere Krämpfe bekamen. Trotz Beendigung der Kohlenoxydzufuhr pflegte dann Atmungsstillstand einzutreten, so daß künstliche Atmung durchgeführt werden mußte. Die erste Blutentnahme nach der Vergiftung wurde vorgenommen, sobald das Tier wieder atmete. Dann betrug der Gehalt an Kohlenoxydhämoglobin 30—50% des Gesamthämoglobins. Das l. a. Eisen, das in vorherigen Kontrolluntersuchungen über mehrere Tage nur geringe Schwankungen der Konzentration zeigte, war dann um 20—40% seiner vorherigen Konzentration vermindert. Das Ausmaß der Verminderung des l. a. Eisens war von der Konzentration des Kohlenoxydhämoglobins abhängig. Wir können aus unseren Messungen diese Beziehung jedoch noch nicht genau festlegen. In allen Versuchen war die Konzentration des l.a. Eisens 24 Stunden nach der Vergiftung wieder auf der ursprünglichen Höhe. In einigen Versuchen, wie auch dem in Tabelle 2 wiedergegebenen, war noch eine kleine Verminderung des l. a. Eisens vorhanden, wenn im Blute kein Kohlenoxyd mehr nachweisbar war. Die Abweichungen waren gering und dürften

Tabelle 2. *Änderung der Konzentration des leicht abspaltbaren Bluteisens und des Kohlenoxydhämoglobins nach kurzer Einatmung von reinem Kohlenoxyd.*
Hund 17 kg. Hb Gesamthämoglobin, HbCO Kohlenoxydhämoglobin, Vb Verdoglobin, l.a.E. leicht abspaltbares Eisen.

Zeit Std.	Hb %	HbCO %	Vb %	l.a.E. mg-%
0	16,1	0	0,2	2,7
	Kohlenoxydvergiftung			
1/4	16,0	7,8	0,2	1,4
3	15,9	3,5	0,2	1,9
6	16,1	1,6	0,2	2,2
12	16,2	0	0,2	2,4
24	15,9	0	0,2	2,6

innerhalb der Streuung liegen. In Tabelle 2 ist ein Versuch wiedergegeben, bei dem ein noch höherer Gehalt an Kohlenoxydhämoglobin im Blute erreicht wurde, als in dem Versuch der Abb. 1.

Wurde die Einatmung von Kohlenoxyd wiederholt, noch bevor die Ausscheidung des bei der ersten Einatmung aufgenommenen Kohlenoxyds beendet war und das l. a. Eisen die ursprüngliche Konzentration wieder erreicht hatte, so sank mit dem erneuten Anstieg der Konzentration des Kohlenoxydhämoglobins die des l. a. Eisens wieder ab. Sie kehrte aber auf den Ausgangswert zurück, sobald das Kohlenoxyd wieder ausgeschieden war. Ein entsprechender Versuch ist in Abb. 3 wiedergegeben.

2. Lang dauernde Einatmung von Kohlenoxyd in niedriger Konzentration.

In den Versuchen, in denen die Hunde Kohlenoxyd in niedriger Konzentration einatmeten, waren sie 6—10 Stunden der Kohlenoxydatmosphäre ausgesetzt. Die Konzentration des Kohlenoxydhämoglobins stieg in dieser Zeit auf 3—5 g Kohlenoxydhämoglobin in 100 ccm Blut an. Bei einem Hunde wurde die Vergiftung am nächsten Tage wiederholt, nachdem am Morgen das am Vortage aufgenommene Kohlenoxyd wieder ausgeschieden und das l. a. Eisen wieder auf den ursprünglichen Wert angestiegen war. Die Ergebnisse des Versuches sind in Tabelle 3 wiedergegeben. Sie bestätigen die in Abb. 3 dargestellten Ergebnisse, daß auch nach lang dauernder Einatmung von Kohlenoxyd das l. a. Eisen 14 Stunden später, wenn das Kohlenoxyd aus dem Blute verschwunden ist, wieder den ursprünglichen Wert erreicht hat. Das dürfte tatsächlich schon früher der Fall gewesen sein, die Analysen wurden aber in diesen Zeitabständen gemacht. Die Wiederholung der Vergiftung am folgenden Tage hatte das gleiche Ergebnis.

Tabelle 3. *Änderung der Konzentration des leicht abspaltbaren Bluteisens und des Kohlenoxydhämoglobins nach wiederholter lang dauernder Einatmung von Kohlenoxyd in niedriger Konzentration.*
Hund 17 kg.

Zeit Std.	Hb %	HbCO %	Vb %	l.a.E. mg-%
0	15,0	0	0,3	2,1
0—6	Einatmung von Kohlenoxyd			
6	15,0	3,2	0,3	1,7
20	15,1	0	0,3	2,0
20—36	Einatmung von Kohlenoxyd			
36	15,2	4,1	0,3	1,6
52	14,8	0	0,3	2,2

3. Die maximale Hemmung der Eisenabspaltung durch Kohlenoxyd.

Durch die Kohlenoxydvergiftung von Warmblütern wird nur eine Verminderung des l. a. Eisens erreicht, die meist unter die Hälfte der ursprünglichen Konzentration nicht hinabgeht. Durch Sättigung des Blutes mit Kohlenoxyd in vitro kann das l. a. Eisen noch weiter vermindert werden. In Übereinstimmung mit Barkan und anderen Autoren fanden

wir, daß durch Sättigung des Blutes mit Kohlenoxyd der Gehalt an l. a. Eisen um etwa $^2/_3$ des ursprünglichen Wertes vermindert wird. So wurden im Blute eines Hundes 2,7 mg-% l. a. Eisen gefunden und nach Sättigung mit Kohlenoxyd 0,8 mg-%, in einem anderen Versuch 3,2 bzw. 1,2 mg-%.

4. Zustand des abgespaltenen Eisens.

Obgleich durch den Zusatz von 0,1 n-Salzsäure das Hämoglobin sehr schnell in Hämatin verwandelt wird, ist der weitaus größte Teil des abgespaltenen Eisens in zweiwertiger Form vorhanden. Der Nachweis der zweiwertigen Form gelingt leicht mit Phenanthrolin oder α,α'-Dipyridyl. In den Lösungen des abgespaltenen Eisens trat ohne Reduktion nach Zusatz von Phenanthrolin die Bildung des gefärbten Phenanthrolin-Eisenkomplexes ein. In Tabelle 4 sind einige Messungen zusammengestellt, in denen die Extinktion des Eisenphenanthrolinkomplexes ohne und mit Reduktion durch Sulfit bestimmt wurde. Die Extinktionsmessungen wurden 24 Stunden nach Bildung des Komplexes durchgeführt.

Tabelle 4. *Anteil des zweiwertigen Eisens an dem durch 0,1 n Salzsäure aus Blut abgespaltenem Eisen.*

Blut	Gesamt-l.a.E. mg-%	Zweiwertiges l.a.E. mg-%
1	3,2	2,5
2	2,6	2,1
3	2,3	2,1

Zusammenfassung.

Das leicht abspaltbare Bluteisen (l. a. Eisen) nahm im Blute von Hunden nach Kohlenoxydvergiftung ab. Die Verminderung trat sofort mit der Aufnahme von Kohlenoxyd ein. Bei einem Kohlenoxydhämoglobingehalt von 40—50% des Gesamthämoglobins sank das l. a. Eisen auf etwa die Hälfte seiner ursprünglichen Konzentration. Mit der Ausscheidung des Kohlenoxyds stieg auch der Gehalt des Blutes an l. a. Eisen wieder an und hatte 24 Stunden nach Beendigung der Vergiftung wieder normale Werte erreicht, dabei war es gleichgültig, ob die Vergiftung durch einmalige oder wiederholte kurzdauernde Einatmung von reinem Kohlenoxyd oder lang dauernde Einatmung niedriger Kohlenoxydkonzentrationen erfolgte. Barkans Angaben, daß das l. a. Eisen noch lange Zeit nach einer Kohlenoxydvergiftung vermindert ist, ließen sich also nicht bestätigen. Damit entfällt eine wichtige Stütze für die Annahme, daß der mit Kohlenoxyd hemmbare Anteil des l. a. Eisen einer vom Hämoglobin verschiedenen Verbindung zukomme. Das abgespaltene Eisen lag zum größten Teil in zweiwertiger Form vor.

Die photometrische Bestimmung des l. a. Eisen durch Bildung eines Phenanthrolin- oder Dipyridylkomplexes im Trichloressigsäurefiltrat wird durch unbekannte Faktoren gestört, die eine Zunahme der Extinktion über viele Stunden bedingen und einen zu hohen Eisengehalt vortäuschen. Durch Verbrennung des Filtrates konnte der Fehler ausgeschaltet werden.

Aus dem Pharmakologischen Institut und dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Kiel in Kappeln an der Schlei.

Darstellung und Eigenschaften von Verdoglobinen.

Von

Manfred Kiese.

Mit 9 Textabbildungen.

(Eingegangen am 22. Mai 1946.)

Der rote Blutfarbstoff kann durch verschiedene Reaktionen in grüne Farbstoffe übergeführt werden. Diese Verdoglobine bestehen wie das Hämoglobin aus einem nativen Protein und einer aus dem Häm entstandenen prosthetischen Gruppe, dem Verd. Gleich dem Häm enthält das Verd Eisen. Die hier beschriebenen Untersuchungen beschäftigen sich vornehmlich mit 3 Verdoglobinen, nämlich dem Verdoglobin$_{CN}$, Verdoglobin$_{S}$ und Verdoglobin$_{NO_2}$. Es gelingt bisher nur durch einen Reaktionsmechanismus ein Verdoglobin zu erhalten, das nur noch geringe Spuren von unverändertem Hämoglobin enthält. In schwach saurer Lösung wird in Gegenwart einer hohen Konzentration von Blausäure Hämoglobin durch einen großen Überschuß von Wasserstoffperoxyd zu Verdoglobin oxydiert[1,2]. Dabei wird der größte Teil des Globins denaturiert, aber der in Lösung verbleibende Teil besteht nur mehr zu 3—0,5% oder weniger aus unverändertem Hämoglobin. Wir fanden später, als wir Verdoglobin für fermentative Gallenfarbstoffbildung brauchten[3], daß die Vollständigkeit der Umwandlung nicht so gut reproduzierbar war wie in den ersten Untersuchungen. Sie ist jedoch immer zu erreichen, wenn die Reaktion bei einer Wasserstoffionenkonzentration von p_H 6,0—6,3 verläuft. Die wechselnde Zusammensetzung der zur Blausäureherstellung verwendeten Cyanidpräparate erfordert jeweils Einstellung mit der verwendeten Phosphorsäure auf ein p_H von etwa 6. Mit anderen Reaktionen konnte bisher eine ebenso weitgehende Umwandlung des Hämoglobins in Verdoglobin nicht erreicht werden. Die Reaktion von Schwefelwasserstoff, Sauerstoff und Hämoglobin, die überhaupt am längsten bekannte Reaktion zur Bildung eines Verdoglobins[4], ist wiederholt auf die Möglichkeit einer vollständigen Umwandlung des Hämoglobins in Verdoglobin untersucht worden[5,6,7,8], aber nie wurde eine auch nur annähernd vollständige

[1] Kiese, M. u. H. Kaeske: Biochem. Z. **312**, 121 (1942). — [2] Kiese, M.: Klin. Wschr. **1942**, 565. — [3] Kesztyüs, L. v. u. M. Kiese: Klin. Wschr. **1943**, 746. — [4] Hoppe-Seyler, F.: Zbl. med. Wiss. **1**, 433 (1863). — [5] Haurowitz, F.: Z. physiol. Chem. **151**, 130 (1926). — [6] Drabkin, D. L. u. J. H. Austin: J. biol. Chem. (Am.) **112**, 51 (1936). — [7] Michel, H. O.: J. biol. Chem. (Am.) **126**, 323 (1938). — [8] Haurowitz, F.: J. biol. Chem. (Am.) **137**, 771 (1941).

Umwandlung erreicht. Auch die Reaktion von Hämoglobin mit Ascorbinsäure und Sauerstoff (LEMBERG, LEGGE und LOCKWOOD[9]) sowie die von Hämiglobinnitrit mit Wasserstoffperoxyd (HAVEMANN[10]) erreichen keine vollständige Umwandlung.

Durch die verschiedenen Reaktionen werden verschiedene Typen von Verdoglobinen gebildet, die sich in ihrer Lichtabsorption und anderen Eigenschaften unterscheiden[11]. In den Mechanismen der Bildung der verschiedenen Verdoglobine bestehen gewisse Ähnlichkeiten, jedoch sind sie durchaus spezifisch. Es handelt sich jeweils um die Einwirkung eines Oxydationsmittels wie Sauerstoff oder Wasserstoffperoxyd auf Hämoglobin und einen weiteren Stoff wie Blausäure, Schwefelwasserstoff, Nitrit, Phenylhydrazin, Arsenwasserstoff und andere[11]. Dabei wird entweder eine Verbindung des betreffenden Stoffes mit dem Hämoglobin von dem Oxydationsmittel oxydiert oder es erfolgt eine Reaktion im Dreierstoß. Da die Verdoglobinbildung mit Blausäure und Wasserstoffperoxyd sehr schnell und sehr weit abläuft, ferner beim Zusammentreffen von Sauerstoff mit Schwefelwasserstoff, Ascorbinsäure, Arsenwasserstoff und anderen die Bildung von Wasserstoffperoxyd nachgewiesen wurde[12,13] und schließlich die Verschiedenheit der einzelnen Verdoglobine noch nicht klar herausgestellt war, erschien die Einwirkung von Wasserstoffperoxyd auf das Hämoglobin schlechthin als das wesentliche bei der Verdoglobinbildung. Diese Auffassung schien durch die Mitteilung gestützt zu werden, daß die Bildung von Verdoglobin$_S$ im Gemisch von Hämoglobin, Schwefelwasserstoff und Sauerstoff durch Zusatz von Wasserstoffperoxyd oder Perborat stark beschleunigt würde[7]. Das trifft jedoch nicht zu. Durch Oxydation von Hämoglobin und Schwefelwasserstoff mit Wasserstoffperoxyd wird zwar auch ein Verdoglobin gebildet, aber nicht Verdoglobin$_S$, sondern Verdoglobin$_{CN}$ oder ein diesem nahe verwandtes. Unter Ausschluß von Sauerstoff und schneller Abfuhr des durch Zerfall von Wasserstoffperoxyd anfallenden Sauerstoffs entsteht nur Verdoglobin$_{CN}$, bei Anwesenheit von Sauerstoff ein Gemisch von Verdoglobin$_S$ und Verdoglobin$_{CN}$. Andererseits vermag Wasserstoffperoxyd durch Reaktion mit Hämiglobinnitrit ein Verdoglobin zu bilden, das sowohl vom Verdoglobin$_S$ wie Verdoglobin$_{CN}$ verschieden ist.

Wie schon diese Feststellungen zeigen, führt aber nicht jede verdoglobinbildende Reaktion zu einem besonderen Verdoglobin, sondern ein bestimmtes Verdoglobin kann durch verschiedene Reaktionen entstehen. Erwähnenswert ist hier das biologisch besonders interessante Verdoglobin$_S$, das nicht nur bei der gekoppelten Oxydation von Hämoglobin und Schwefel-

[9] LEMBERG, R., J. W. LEGGE, W. H. LOCKWOOD: Biochem. J. (Brit.) **33**, 754 (1939). — [10] HAVEMANN, R.: Biochem. Z. **308**, 1 (1941). — [11] KIESE, M. u. L. SEIPELT: Arch. exper. Path. (D) **200**, 648 (1943). — [12] SCHALES, O.: Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 447 (1938). — [13] HENZE, C.: Klin. Wschr. **1938 I**, 24.

wasserstoff durch Sauerstoff entsteht, sondern auch durch die Umsetzung von Hämoglobin mit Hydroxylamin und Sauerstoff oder von Hämoglobin mit Arsenwasserstoff und Sauerstoff. Diese Tatsache ist von Bedeutung für die Vorstellungen, die wir vom Bau des Verdoglobin$_S$ haben können. Bisher wurde in verschiedenen Formen die Vorstellung HOPPE-SEYLERS aufrecht erhalten, daß es sich beim Verdoglobin$_S$ um eine Schwefelverbindung des Hämoglobins handle — daher der alte Name „Sulfhämoglobin". Noch jüngst wurde die Bildung einer — SO_2-Brücke zwischen Methin- und Vinylgruppe des Porphyrins als wesentliche Veränderung des Hämoglobins angenommen (HAUROWITZ[9]). Die Umwandlung einer Methinbrücke in eine >C=S-Brücke (NIJELD[14]) ist wohl noch wahrscheinlicher, wenn es sich überhaupt um Einführung von Schwefel ins Molekül handelt. Der Schwefel würde dann nämlich an Stelle von Sauerstoff treten, der bei anderen Verdoglobinen an dieser Stelle vorhanden ist. Verschiedene Reaktionen, die das gleiche Verdoglobin bilden, können sich unterstützen. So wird die Bildung von Verdoglobin$_S$ aus Hämoglobin, Schwefelwasserstoff und Sauerstoff durch den Zusatz von Hydroxylamin stark beschleunigt. Hydroxylamin allein bildet nur verhältnismäßig wenig Verdoglobin.

Während bei der Bildung von Verdoglobin durch Blausäure und Wasserstoffperoxyd oder Schwefelwasserstoff und Sauerstoff Hämiglobin nicht oder nur sehr wenig reagiert und vornehmlich das Hämoglobin reaktionsfähig ist, entsteht das Verdoglobin$_{NO_2}$ aus Hämiglobin in Gegenwart eines Überschusses von Nitrit, das mit Hämiglobin eine reversible Verbindung bildet (HAVEMANN[15]). Dies Hämiglobinnitrit wird von Wasserstoffperoxyd zu Verdoglobin$_{NO_2}$ oxydiert. Als Oxydationsmittel kann wohl auch Sauerstoff oder salpetrige Säure dienen, jedenfalls kann die Verdoglobinbildung in saurer Lösung durch Nitrit auch ohne Zusatz von Wasserstoffperoxyd erfolgen, allerdings wesentlich langsamer. Das ist zuerst am Muskelhämoglobin beobachtet worden, das sowohl in Pökellake wie in gepökeltem Fleisch vergrünen kann als auch in saurer Lösung nach Zusatz von Nitrit (BECHTOLD[16], HAVEMANN[15]). Ähnliche Verhältnisse liegen wahrscheinlich bei der Verdoglobinbildung durch Hydroxylamin vor. Hydroxylamin oxydiert Hämoglobin zu Hämiglobin und bildet im Überschuß mit dem Hämiglobin eine Verbindung, deren Lichtabsorption der des Hämiglobinnitrits ähnlich ist. Diese Verbindung wird durch überschüssiges Hydroxylamin und Sauerstoff in geringem Ausmaße zu Verdoglobin oxydiert. Sie reagiert aber schnell und weitgehend mit Schwefelwasserstoff und Sauerstoff. Darauf beruht wahrscheinlich die starke Beschleunigung der Bildung von Verdoglobin$_S$ mit Schwefelwasserstoff und Sauerstoff durch Zusatz von Hydroxylamin.

[14] NIJELD, H. A. W.: Rec. Trav. chim. Pays-Bas **62**, 293 (1943). — [15] HAVEMANN, R.: Klin. Wschr. **1944**, 179. — [16] BECHTOLD, E.: Der Muskelfarbstoff. Stuttgart 1935. — Biochem. Z. **311**, 426 (1942).

Der Nachweis einer Verbindung des Hydroxylamins mit dem Hämiglobin ist auch von Interesse für die Reaktion von Hämiglobin mit Nitrit und dürfte eine weitere Stützung der Schlüsse von KOBERT[17], HAVEMANN[15] und REMMER[18] sein, daß Nitrit eine Verbindung mit Hämiglobin bildet.

Dem zweiten Stoff, der neben dem Hämoglobin in die gekoppelte Reaktion zur Verdoglobinbildung eingeht, kommt eine wichtige reaktionslenkende Wirkung zu, wodurch bei Anwendung des gleichen Oxydationsmittels verschiedene Verdoglobine entstehen können und auch die Nebenreaktionen beeinflußt werden. In Gegenwart von Nitrit oxydiert Wasserstoffperoxyd Hämoglobin zu $\text{Verdoglobin}_{NO_2}$, in Gegenwart von Blausäure oder Schwefelwasserstoff aber zu Verdoglobin_{CN}. Blausäure wie Schwefelwasserstoff hemmen die Oxydation des Hämoglobins durch Wasserstoffperoxyd zu Hämiglobin, wie die Anwesenheit von Hämoglobin im Gemisch von Hämoglobin, Verdoglobin, Schwefelwasserstoff und Wasserstoffperoxyd zeigt. Da unter diesen Bedingungen nur Hämoglobin und nicht Hämiglobin zu Verdoglobin oxydiert wird, ist die Bedeutung der Wirkung des zweiten Stoffs für die Verdoglobinbildung leicht einzusehen. Auch die Ausbeute an Verdoglobin, bezogen auf das verbrauchte Wasserstoffperoxyd ist verschieden. Um das in 1 ccm roten Zellen enthaltene Hämoglobin zu mehr als 90% in Verdoglobin umzuwandeln, wurden bei Gegenwart von Nitrit 0,04 ccm 30%iges Wasserstoffperoxyd verwendet, bei Gegenwart von Schwefelwasserstoff 0,06 ccm und bei Gegenwart von Blausäure 0,33 ccm. Die Einwirkung größerer Mengen von Wasserstoffperoxyd in Gegenwart von Schwefelwasserstoff baut das Häm und das Verd zu farblosen Produkten ab. Auch in Gegenwart von Nitrit können so große Wasserstoffperoxydmengen wie in Gegenwart von Blausäure nicht angewandt werden, ohne das Protein vollständig auszufällen. Die anzuwendende Menge Wasserstoffperoxyd beträgt auch bei Gegenwart von Schwefelwasserstoff oder Nitrit weit mehr als die für die Oxydation des Porphyrins selbst erforderliche Menge.

Die verdoglobinbildenden Reaktionen werden durch eine Reihe von Faktoren wesentlich beeinflußt: Konzentration der Reaktionspartner, Konzentration der Wasserstoffionen und Temperatur. Für die Verdoglobinbildung ist sowohl hinsichtlich Geschwindigkeit wie Ausmaß eine Wasserstoffionenkonzentration von p_H etwa 6 am günstigsten. Da dies bei den drei verschiedenen Bildungsmechanismen, die hier behandelt werden, in gleicher Weise zutrifft, ist anzunehmen, daß der Lösungszustand des Hämoglobins für die Reaktion von Bedeutung ist. Die Bildung von Verdoglobin_{CN} verläuft am vollständigsten, wenn Hämoglobin und vor allem Blausäure und Wasserstoffperoxyd in hoher Konzentration vorhanden

[17] KOBERT, R.: Arch. ges. Physiol. 82, 603 (1900). — [18] REMMER, K.: Diss. Berlin 1945.

sind[1]. Die Mischung der verschiedenen Reaktionspartner bedingt einen erheblichen Anstieg der Temperatur der Lösung. Bei größeren Ansätzen, wie sie in früheren Untersuchungen gemacht wurden[1], hält die Temperaturerhöhung eine Weile an. Kleinere Ansätze werden zweckmäßig eine Stunde im Wasserbad von 38—40° gehalten und dann in der Kälte dialysiert.

Die Oxydation von Hämoglobin zu Verdoglobin$_S$ liefert die besten Ausbeuten, wenn eine Hämoglobinlösung von 5—7 g in 100 ccm bei p_H 6 mit Schwefelwasserstoff von 700—750 mm Hg Druck und Sauerstoff von 10—20 mm Hg reagiert. Die Reaktion verläuft mit höheren Sauerstoffdrucken schneller, doch ist die Ausbeute an Verdoglobin$_S$ dann geringer. Unter den oben genannten Bedingungen werden Lösungen gewonnen, die etwa 80% des Globins als Verdoglobin$_S$ und den Rest als unverändertes Hämoglobin enthalten. Erhöhung der Temperatur erhöht den Anteil an Verdoglobin nicht. Obwohl Hydroxylamin die Verdoglobinbildung sehr beschleunigt, wird durch seine Mitwirkung der Anteil an Verdoglobin im Reaktionsprodukt ebenfalls nicht erhöht.

Mit dem geringsten Verlust an Blutfarbstoff verläuft die Oxydation von Hämiglobinnitrit zu Verdoglobin$_{NO_2}$. Die Hämoglobinkonzentration ist auch hier am zweckmäßigsten etwa 5 g in 100 ccm. Nitrit ist in einer Konzentration von 0,01 mol je Liter erforderlich. Höhere Konzentrationen verbessern die Ausbeute nicht mehr merklich. Wasserstoffperoxyd genügt in einer Konzentration von 5—10 · 10^{-3} Mol je Liter. Höhere Konzentrationen denaturieren mehr Protein, ohne den Anteil an Verdoglobin in der endlichen Lösung zu erhöhen. Diese enthalten neben dem Verdoglobin$_{NO_2}$ 3—8% des in Lösung verbliebenen Globins als Hämiglobin. Die Reaktion zwischen Hämiglobinnitrit und Wasserstoffperoxyd verläuft recht schnell, so daß die Lösung 1—2 Min. nach der Mischung bereits von dunkelgrüner Farbe ist. Erhöhung der Temperatur auf 40° beschleunigt die Reaktion ohne den Rest von unverändertem Hämoglobin zu vermindern. Zusatz von Kupfer beschleunigt in niedriger Konzentration die Bildung von Verdoglobin$_{NO_2}$ und ermöglicht die besten Ausbeuten.

Die Unvollständigkeit des Ablaufs der Verdoglobinbildung kann zweierlei Ursachen haben. Einerseits kann das Hämoglobin durch Nebenreaktionen dem Zugriff der verdoglobinbildenden Reaktion entzogen werden. Das ist tatsächlich der Fall. Bei der Reaktion mit Blausäure und Wasserstoffperoxyd sowohl wie der mit Schwefelwasserstoff und Sauerstoff wird ein Teil des Hämiglobins zu Hämoglobin oxydiert. Aus Hämiglobin wird aber unter diesen Bedingungen kein Verdoglobin gebildet. Jedoch bilden Schwefelwasserstoff und Sauerstoff in Gegenwart von Hydroxylamin auch aus Hämiglobin Verdoglobin$_S$, und die Bildung von Verdoglobin$_{NO_2}$-Nitrit und Wasserstoffperoxyd verläuft überhaupt mit Hämiglobin. Es ist somit als weitere Möglichkeit zu erwägen, daß die Verdoglobinbildung eine Reaktion ist, die bei einem Gleichgewicht stehen bleibt

Einen direkten Hinweis darauf bietet auch die Beobachtung, daß aus dem Verdoglobin$_S$ gebildete Verdochromogene wenig beständig sind. Gewichtiger ist schon die Beobachtung, daß die Absorptionskurven der verschiedenen Gemische bei der Überführung von Hämoglobin in Verdoglobin$_S$ einen isobestischen Punkt bilden, wie er für reversibel ineinander überführbare Verbindungen charakteristisch ist. Bestätigt wird die Vermutung durch die wirkliche Überführung von Verdoglobin in eine Verbindung, die von Hämoglobin spektrophotometrisch nicht zu unterscheiden ist. Am besten gelingt die Reduktion des Verdoglobins zu Hämoglobin mit dem Verdoglobin$_{NO_2}$. In Karbonatlösung vom p_H 10 unter Luftabschluß wird im Laufe von 10—20 Stunden mehr als die Hälfte des Verdoglobins$_{NO_2}$ durch Dithionit zu Hämoglobin reduziert. Schneller verläuft die Reaktion des Verd zu Häm als Verdochromogen, und zwar in Pyridin schneller als in Hydrazinhydrat. Aus dem Verd$_{NO_2}$ wird in wäßriger Hydrazinhydratlösung ein Hämochromogen mit dem Maximum der α-Bande bei 552 mμ gebildet. Das Verd$_S$ läßt sich nur schwieriger zu Häm reduzieren und das Verd$_{CN}$ ist mit den angewandten einfachen Verfahren nicht in Häm zurückzuführen.

Ebenso wie die Bindung an Kohlenoxyd das Hämoglobin gegen den Übergang in Verdoglobin stabilisiert, wird auch Verdoglobin durch Bindung an Kohlenoxyd beständiger gegen die Reduktion zu Hämoglobin. Die bei der Umwandlung von Hydrazinverdochromogen$_{NO_2}$ in Hydrazinhämochromogen wahrnehmbaren spektroskopischen Veränderungen hat BECHTOLD[15] bereits beschrieben. Allerdings gibt er keine spektrophotometrischen Daten, die sicher beweisen, daß in dem ihm vorliegenden Gemisch von Verdochromogen und Hämochromogen nicht lediglich das Verdochromogen zerstört wurde und das übrigbleibende Hämochromogen die Lösung rot färbte. BECHTOLD beobachtete die Veränderung offenbar nur gelegentlich und konnte die Bedingungen, unter denen sie eintritt, nicht näher definieren. Die Reduktion des Verd$_{NO_2}$ zu Häm durch Hydrazinhydrat gelingt immer in einer Lösung von 20—30% Hydrazinhydrat unter Ausschluß von Sauerstoff. Die Umwandlung eines grünen Chromogens in ein rotes beschreiben auch LEMBERG, CORTIS-JONES und NORRIE[19]. Die Oxydation von Pyridinhämochromogen mit Wasserstoffperoxyd in Gegenwart von Ascorbinsäure und unter Ausschluß von Sauerstoff ergibt eine grüne Verbindung mit einer Bande bei 639 mμ, aus der durch Reduktion mit Dithionit wieder eine rote mit Banden bei den gleichen Wellenlängen wie Protohämochromogen erhalten wird. Die Autoren nehmen an, daß die nach Reduktion wieder erhaltene rote Verbindung ein Oxyhämochromogen und die grüne Verbindung das entsprechende Hämichromogen ist. Die hier beschriebenen grünen Verbindungen, welche zu Hämoglobin

[19] LEMBERG, R., B. CORTIS-JONES u. M. NORRIE: Biochem. J. (Brit.) **32**, 171 (1938).

bzw. Hämochromogen reduziert werden können, sind zweifellos solche mit zweiwertigem Eisen, denn sie bilden Kohlenoxydverbindungen.

Unter Berücksichtigung dieser Beobachtungen erscheint es verständlich, daß eine vollständige Überführung des Hämoglobins in Verdoglobin$_{NO_2}$ nicht gelingt. Andererseits überrascht nicht, daß Verdoglobin$_{CN}$ mit nur geringsten Verunreinigungen von Hämiglobin erhalten werden kann. Der Stillstand der Bildung von Verdoglobin$_S$ fast auf halbem Wege dürfte im wesentlichen auf die weniger stark oxydierende Wirkung von Schwefelwasserstoff mit Sauerstoff zurückzuführen sein verglichen mit den hohen Konzentrationen von Wasserstoffperoxyd in den beiden anderen Fällen.

Tabelle 1. *Wellenlänge und Extinktionskonstante der Extinktionsmaxima von Verdoglobinen, Hämiglobin und Verdoperoxjdase.*

Protein	Rotes Maximum		Blaues Maximum	
	Wellenlänge mμ	Extinktionskonstante $K \cdot 10^{-7}$	Wellenlänge mμ	Extinktionskonstante $K \cdot 10^{-7}$
Verdiglobin$_{CN}$.	595	2,5	418	16,0
Verdoglobin$_{CN}$.	630	3,5	430	21,0
Verdiglobin$_{NO_2}$.	615	3,1	400	13,7
Verdoglobin$_{NO_2}$.	620	3,7	420	11,6
Verdoglobin$_S$ . .	620	2,9	420	14,0
Hämiglobin . .	630	1,0	405	36,0
Verdoperoxydase . . .	638	4,2	475	15,0
Verdiperoxydase . . .	625	1,5	430	15,6

Lichtextinktionskurven von Verdoglobinen, insbesondere dem Verdoglobin$_S$, sind bereits in größerer Zahl veröffentlicht worden. Abgesehen von den Extinktionskurven des Verdoglobin$_{CN}$ beziehen sie sich auf Gemische von Verdoglobin mit einem erheblichen Anteil von unverändertem Häm. Auch die durch Extrapolation ermittelten Extinktionswerte für „reines Verdoglobin$_S$" (Drabkin und Austin[20]) sind solche eines Gemisches von Verdoglobin$_S$ und Hämiglobinsulfid. Die vorhandenen Daten beschränken sich auch auf einen Bereich von 700—450 mμ. Neben den Extinktionskonstanten in diesem Gebiet sind die des violetten Bereichs von besonderem Interesse, da das Hämoglobin und seine Derivate hier die weitaus stärkste Extinktion besitzt. Die im folgenden veröffentlichten Extinktionskurven dreier Verdoglobine erstrecken sich auf den Bereich von 700—300 mμ. Sie beziehen sich jeweils auf das reine Verdoglobin.

In Tabelle 1 sind die Wellenlängen und Extinktionskonstanten der Extinktionsmaxima der Verdoglobine zusammengestellt und zum Vergleich Hämiglobin und Verdoperoxydase angefügt. Die Extinktionskonstanten der Verdoglobine im roten Gebiet sind wesentlich höher als die des Hämiglobins. Diese Tatsache hat eine praktisch-medizinische Bedeutung. Sowohl Hämiglobin wie Verdoglobin können unter pathologischen Bedingungen vermehrt im Blute auftreten und verleihen dem Patienten dann

[20] Drabkin, D. L. u. J. H. Austin: J. biol. Chem. (Am.) **112**, 57 (1935).

cyanotisches Aussehen. Es genügt also vom Verdoglobin eine weit geringere Konzentration als vom Hämiglobin eine Cyanose zu erzeugen. Die Extinktion im blauen Gebiet ist bei allen Verdoglobinen erheblich geringer als die des Hämoglobins. Abgesehen vom Verdiglobin$_{NO_2}$, das eine breite von 500—300 mμ reichende Bande mit nur wenig hervortretendem Maximum aufweist, sind die Extinktionskurven in diesem Gebiet insofern denen des Hämoglobins ähnlich als sie schmale intensive Banden zwischen 450 und 400 mμ besitzen. Zwischen 400 und 300 mμ ist die Extinktion ebenso groß bzw. größer als die des Hämoglobins. Aus den weißen Blutzellen hat AGNER[21] eine grüne Peroxydase isoliert. Diese Verdoperoxydase steht vielleicht den Verdoglobinen nahe. Einer starken Extinktion im roten Gebiet, die bei der Verdo-Form die der Verdoglobine noch ein wenig übertrifft, verdankt sie grüne Farbe. Die Stärke der Extinktion im blauen Gebiet entspricht der der Verdoglobine. Jedoch liegen die Absorptionsmaxima etwas mehr im langwelligen Gebiet. Während bei den Verdiglobinen ein zweites Maximum um 560—570 mμ nur eben wahrnehmbar ist, weist die Verdiperoxydase ein Maximum bei 570 mμ auf mit fast der doppelten Extinktion wie bei 625 mμ. Bilirubin, das vergleichsweise noch interessiert hat in Chloroformlösung eine breite Bande zwischen 500 und 400 mμ. Ihr Extinktionsmaximum liegt bei 445 mμ und hat eine Extinktionskonstante von $K = 9 \cdot 10^7$. Die Extinktionskurven der Verdoglobine im violetten und ultravioletten Gebiet entsprechen mehr denen des Hämoglobins als des Bilirubins.

Die Extinktionskurven des Verdoglobin$_S$ und Verdoglobin$_{NO_2}$ legen die Vermutung nahe, daß diese Verbindungen identisch wären. Beide lassen sich wieder zu Häm reduzieren. Jedoch verläuft die Reduktion beim Verdoglobin$_{NO_2}$ wesentlich leichter als beim Verdoglobin$_S$. Einwandfreie Unterschiede bestehen auch in der Extinktion der Hydrazinverdochromogene. Das Hydrazinverdochromogen$_S$ hat ein Maximum bei 605 mμ, das Hydrazinverdochromogen$_{NO_2}$ aber bei 615 mμ. Ferner ist das Eisen im Verdoglobin$_S$ in der zweiwertigen Form sehr beständig. Nach der Dialyse des Ansatzes zur Darstellung liegt das Protein als Verdoglobin vor, während mit Nitrit und Wasserstoffperoxyd Verdiglobin$_{NO_2}$ erhalten wird.

Die Verdiglobine unterscheiden sich vom Hämiglobin auch darin, daß ihre Lichtextinktion im Bereich von p_H 5—10 von Wasserstoffionen nicht beeinflußt wird. Zusatz von Blausäure oder Stickstoffwasserstoffsäure ändert ihre Extinktion auch nicht. Ferner vermögen Azid und Fluorid die Reduktion des Verdiglobin$_{CN}$ durch Ascorbinsäure nicht zu hemmen wie die Reduktion des Hämiglobins. Man darf somit annehmen, daß Verdiglobin diese Verbindungen nicht an sein Eisen bindet. Entweder enthält das Eisen des Verdiglobins keine elektrolytisch abtrennbare Hy-

[21] AGNER, K.: Acta physiol. scand. II Suppl. 8 (1941).

droxylgruppe, oder ihre Dissoziationskonstante ist so klein, daß auch bei p_H 5 noch keine Dissoziation eintritt.

Über die Konstitution der prothetischen Gruppe der Verdoglobine kann freilich erst nach ihrer Abtrennung und Analyse Sicheres ausgesagt werden. Immerhin lassen die vorliegenden Untersuchungen bereits einige Annahmen zu. So spricht die Reduktion des Verdoglobin$_{NO_2}$ zu Hämoglobin dafür, daß bei dieser Verbindung der Porphinring noch nicht geöffnet ist. Die Herausspaltung einer Methingruppe ist jedenfalls auszuschließen. Dafür spricht auch der geringe Sauerstoffverbrauch bei der Oxydation. Zur Umwandlung eines Äquivalent Hämoglobin in Verdoglobin$_{NO_2}$ werden weniger als 2 Mole Wasserstoffperoxyd verbraucht (Tabelle 7). Wahrscheinlich wird also bei dieser Reaktion nur ein Sauerstoffatom in das Porphyrin aufgenommen. Auf die Verschiedenheit der einzelnen Verdoglobine ist schon wiederholt hingewiesen worden. Beobachtungen, die ausführlich in einer weiteren Mitteilung beschrieben werden, zeigen, daß nicht bei allen Verdoglobinen eine Oxydation an einer Methinbrücke vorliegt, die zur Bildung von Gallenfarbstoff in Eisessig führt. Vielmehr gibt es Verdoglobine, bei denen die Seitenketten des Protoporphyrins verändert sind.

Versuche.

I. Methodik.

Für alle Untersuchungen wurde krystallines Pferdehämoglobin[22–25] oder Rinderhämoglobin verwendet, das aus gewaschenen roten Zellen durch Hämolyse mit der gleichen Menge Wasser erhalten wurde. Die Bestimmung des Hämoglobingehaltes erfolgte als Hämiglobin nach dem Verfahren von Evelyn[26] und Havemann[27]. In Lösungen von Verdoglobin oder Gemischen von Verdoglobin und Hämoglobin wurde der Gehalt an Gesamtglobin nach Dialyse aus dem Eisengehalt ermittelt. Der Anteil an unverändertem Häm wurde aus der Differenz der Extinktion der Hydrazin- oder Pyridinchromogene oder der Kohlenoxydverbindungen zwischen einem Maximum und Minimum im Gebiet von 550—500 mμ errechnet. Eisen wurde als Phenanthrolinkomplex photometrisch bestimmt.

Extinktionsmessungen im sichtbaren Gebiet wurden mit dem Spektrophotometer von Zeiss-Ikon durchgeführt. Zur Extinktionsmessung im violetten und ultravioletten Gebiet diente ein Doppelmonochromator nach Pohl mit Steinsalzprismen, Quarzlinsen und Photozellen mit Natriumkathode. Als Lichtquellen für das violette und ultraviolette Gebiet

[22] Heidelberger, M.: J. biol. Chem. (Am.) **59**, 31 (1922). — [23] Ferry, R. M. u. A. A. Green: J. biol. Chem. (Am.) **81**, 175 (1929). — [24] Green, A. A.: J. biol. Chem. (Am.) **93**, 495 (1931). — [25] Taylor, J. F. u. A. B. Hastings: J. biol. Chem. (Am.) **131**, 649 (1939). — [26] Evelyn, K. A. u. H. T. Malloy: J. biol. Chem. (Am.) **126**, 655 (1938). — [27] Havemann, R., F. Jung, B. v. Issekutz jun.: Biochem. Z. **301**, 116 (1939).

wurden verwandt: Eine 1000-Watt-Glühlampe, die Quecksilber- und die Cadmiumspektrallampe von Osram, ferner der Eisenbogen nach PFUNDT[28].

Als Maß für die Extinktion wurde die Extinktionskonstante angegeben,

$$K = \ln \frac{I_0}{I} \cdot \frac{1}{c} \cdot \frac{1}{d} .$$

c Konzentration in Grammatom Eisen im ccm, d Schichtdicke in cm.

II. Darstellung des Verdoglobin$_{CN}$.

Die früher erreichte vollständige Umwandlung des Hämoglobins in Verdoglobin$_{CN}$[1] hatte sich bei späteren Versuchen nicht mit gleicher Regelmäßigkeit reproduzieren lassen. Als Ursache ergaben sich Schwankungen der Wasserstoffionenkonzentration in Abhängigkeit von dem angewandten Cyanidpräparat. Darum wurde jeweils die für angewandte Cyanidmenge zur Erreichung eines p_H von 6,0 erforderliche Menge Phosphorsäure durch Bestimmung der Wasserstoffionen mit der Glaselektrode ermittelt.

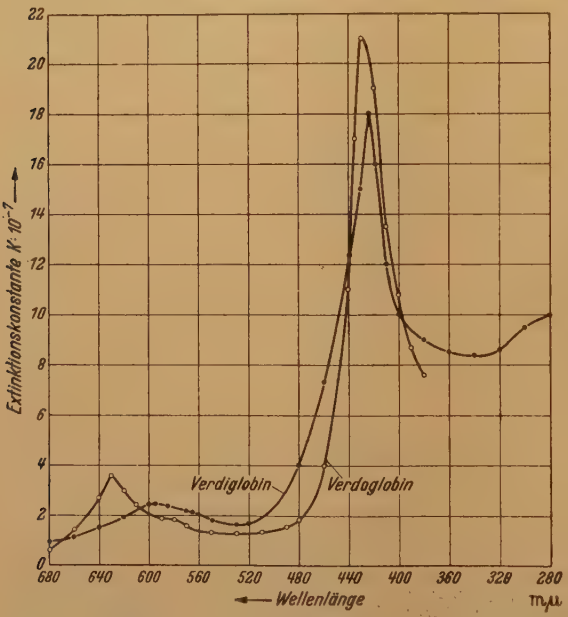


Abb. 1. Extinktion des Verdoglobin$_{CN}$ und Verdiglobin$_{CN}$. ooo Verdoglobin, ••• Verdiglobin. Abszisse: Wellenlänge in mμ. Ordinate: Extinktionskonstante $K = \ln \frac{I_0}{I} \cdot \frac{1}{c} \cdot \frac{1}{d}$ c Konzentration in Grammatom Fe/ccm; d Schichte in cm.

In ein Reagenzglas von 100 ccm wurden 2 g Kaliumcyanid eingewogen und in 31 ccm Wasser gelöst. Sofort nach Zusatz von 5 ccm Phosphorsäure (50 g H_3PO_4 in 100 ccm) wurden in der Lösung 9 ccm rote Zellen vom Rinde suspendiert und unter kräftigem Rühren 3 ccm Perhydrol (Merck) zugefügt. Dann wurde das Gefäß mit einem Korkstopfen leicht verschlossen und für eine Stunde in ein Wasserbad von 38—40° gebracht. Anschließend wurde mehrere Tage im Cellophanschlauch in der Kälte gegen fließendes Wasser dialysiert. Bei der Umsetzung war der größte Teil des Globins denaturiert worden. Nach dem Zentrifugieren blieb eine Lösung mit 0,5—1 g Verdiglobin in 100 ccm.

[28] PFUNDT, A. H.: Astrophysic. J. 27, 296 (1908).

III. Extinktionskonstanten des Verdoglobin$_{CN}$.

Für die Messung der Extinktion des Verdoglobin$_{CN}$ wurden Lösungen verwendet, die weniger als 5% des Globins als unverändertes Hämoglobin enthielten. Der Farbstoff lag nach der Dialyse als Verdiglobin vor. Vom denaturierten Protein wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und dann von der Stammlösung geeignete Verdünnungen hergestellt. Diese enthielten 0,01 Mol/l Phosphat vom p_H 6,8. Das Verdoglobin wurde durch Reduktion mit Dithionit erhalten. Aus dem Mittel von je 6 Messungen wurden die in Abb. 1 wiedergegebenen Kurven konstruiert. Die genauen Werte der Extinktionskonstanten bei verschiedenen Wellenlängen sind aus Tabelle 2 zu entnehmen. Verdoglobin$_{CN}$ hat sowohl im roten wie im blauen Gebiet eine stärkere Extinktion als Verdiglobin.

Die Extinktionsmaxima liegen ein wenig weiter im kurzwelligen Gebiet. Beide haben noch im gelben bzw. grünen Gebiet ein eben erkennbares Maximum, das Verdiglobin$_{CN}$ etwa bei 565 mμ und das Verdoglobin bei 580 mμ. Im blauen Gebiet steigen die Extinktionskurven steil an und fallen auch wieder steil ab wie die des Hämoglobins, doch erreichen sie nur etwa die halbe Höhe der des Hämoglobins. Auch ist die Lage des Maximums von der des Hämiglobins und Hämoglobins verschieden, nämlich Verdiglobin$_{CN}$ bei 423 mμ und Verdoglobin$_{CN}$ 430 mμ. Im langwelligen ultravioletten Gebiet ist die Extinktion des Verdiglobin$_{CN}$ höher als die des Hämiglobins und steigt gegen 290 mμ noch an. Für das Verdoglobin$_{CN}$ und Verdoglobin$_{NO_2}$ werden Konstanten für dieses Gebiet nicht angegeben, da das zur Reduktion verwendete Dithionit hier sehr stark absorbiert.

Tabelle 2. *Extinktionskonstanten des Verdiglobin$_{CN}$ und Verdoglobin$_{CN}$.*

$$K = \ln \frac{I_0}{I} \cdot \frac{1}{c} \cdot \frac{1}{d};$$

c Konzentration in Grammatom Fe/ccm
d Schichte in ccm.

Verdiglobin$_{CN}$		Verdoglobin$_{CN}$	
λ mμ	$K \cdot 10^{-7}$	λ mμ	$K \cdot 10^{-7}$
680	0,86	680	0,62
660	1,12	660	1,36
640	1,49	640	2,72
620	1,92	630	3,53
600	2,39	620	2,97
595	2,44	610	2,42
585	2,35	590	1,86
570	2,14	580	1,86
565	2,10	570	1,54
550	1,80	550	1,36
530	1,64	530	1,23
510	1,67	510	1,36
480	4,0	490	1,54
460	7,3	480	1,8
440	12,4	460	4,0
430	15,0	440	11,0
423	18,0	435	17,0
418	16,0	430	21,0
410	12,0	420	19,0
400	10,0	410	13,5
380	9,0	400	10,8
360	8,5	390	8,7
340	8,4	380	7,6
320	8,6		
300	9,5		
290	10,0		

Die Extinktion des Verdiglobin$_{CN}$ wurde von Wasserstoffionen im Bereich von p_H 5—10 nicht beeinflußt und wurde auch durch Zusatz von Blausäure oder Stickstoffwasserstoffsäure nicht verändert.

IV. Eigenschaften des Verdoglobin$_{CN}$.

Über das chemische Verhalten des Verdoglobin$_{CN}$ ist in früheren Veröffentlichungen[1, 11] schon einiges berichtet worden, so die leichte Oxydation durch Sauerstoff, die geringe Festigkeit der Kohlenoxydbindung. Eine der auffälligsten Erscheinungen ist das Fehlen einer Änderung der Lichtabsorption des Verdiglobin$_{CN}$ unter dem Einfluß von Wasserstoffionen und Blausäure, das vermuten ließ, daß das Verdiglobin$_{CN}$ mit Cyanid, Azid, Fluorid u. a. keine Verbindung bildet. Diese Annahme wurde auf einem anderen Wege bestätigt. Die Reduktion des Hämiglobins durch die verschiedensten Stoffe wurde gehemmt, wenn das Hämiglobin in eine Verbindung wie Hämiglobincyanid, -azid, -fluorid oder ähnliche übergeführt würde. Es ist anzunehmen, daß die Reduktion des Verdiglobins zu Verdoglobin ebenfalls gehemmt würde, wenn es eine Verbindung mit Cyanid bildete. Ferner vermag Hämiglobin die Oxydation des Hämoglobins zu Hämiglobin durch Chlorat zu katalysieren[29, 30]. Diese Wirkung setzt wahrscheinlich eine Bindung des Chlorats an das Eisen des Hämiglobins voraus, denn sie wird durch Cyanid gehemmt.

Tabelle 3. *Die Reduktion von Hämiglobin und Verdiglobin$_{CN}$ durch Ascorbinsäure.*

Hämiglobin	1,8 g/100 ccm
bzw. Verdiglobin$_{CN}$	1,9 g/100 ccm
Ascorbinsäure	0,05 g/100 ccm
Pyrophosphat p_H 6,9	0,03 Mol/l
Natriumazid	0,003 Mol/l

Temperatur: 37°.

Anfangsgeschwindigkeit der Reduktion. Aufnahme von ccm CO durch 3,6 ccm der Lösung in 10 Min.

	Hb^{III}	Vb^{III}
Ohne Azid	10,0	7,0
Mit 0,003 Mol/l Azid	0	6,5

Tabelle 4. *Wirkung des Fluorids auf die Reduktion von Hämiglobin und Verdiglobin$_{CN}$ durch Ascorbinsäure.*

Hämiglobin	2,9 g/100 ccm
bzw. Verdiglobin	1,9 g/100 ccm
Ascorbinsäure	0,05 g/100 ccm
Phosphat p_H 7,4	0,02 Mol/l
Natriumfluorid	0,2 Mol/l

Temperatur: 37°.

Anfangsgeschwindigkeit der Reduktion. Aufnahme von cmm CO durch 3,6 ccm der Lösung in 10 Min.

	Hb^{III}	Vb^{III}_{CN}
Ohne Fluorid	10,0	7,0
Mit 0,2 Mol/l Fluorid	4,5	7.0

[29] HEUBNER, W. u. F. JUNG: Schweiz. med. Wschr. **1941**, 247. — Ber. dtsch. chem. Ges. **75**, 1636 (1942). — [30] KIESE, M., E. SAVINI u. W. SCHWARTZKOPFF: Biochem. Z. **317**, 32 (1944).

Die Reduktion des Hämiglobins und Verdiglobins wurde mit Ascorbinsäure durchgeführt und wie in früheren Untersuchungen[31] manometrisch im WARBURG-Apparat gemessen durch Bestimmung der von dem gebildeten Hämoglobin bzw. Verdoglobin aus dem Gasraum aufgenommene Menge Kohlenoxyd. Die angewandten Konzentrationen des Hämiglobins bzw. Verdiglobins, der Ascorbinsäure, des Puffers und des Azids bzw. Fluorids sind aus Tabelle 3 und 4 zu entnehmen. Die in diesen Tabellen wiedergegebenen Versuche zeigen einwandfrei, daß die Reduktion des Verdiglobins durch Azid und Fluorid nicht gehemmt wird, während die des

Tabelle 5. *Einfluß von Verdiglobin$_{CN}$ und Hämiglobin auf die Oxydation des Hämoglobins durch Chlorat zu Hämiglobin.*

Hb^{II} . . . . . 0,12 g/100 ccm
Hb^{III} . . . . . 0,002 g/100 ccm
$NaClO_3$ 0,1 Mol/1
Phosphat p_H 6,6 . . . 0,02 Mol/1
Temperatur: 17°.

Zusatz	Hb^{III} in g/100 ccm gebildet in Minuten nach Zugabe von Chlorat			
	2	4	6	8
—	0,002	0,005	0,010	0,017
0,011 g/100 ccm Vb^{III}_{CN} . .	0,002	0,006	0,010	0,018
0,012 g/100 ccm Hb^{III} . .	0,005	0,012	0,020	0,030

Hämiglobins durch Azid vollständig gehemmt und durch Fluorid in der angewandten Konzentration auf die halbe Geschwindigkeit vermindert wird.

Die Bedingungen, unter denen die katalytische Wirkung des Hämiglobins und Verdiglobins auf die Oxydation des Hämoglobins durch Chlorat zu Hämiglobin geprüft wurde, sind aus Tabelle 5 ersichtlich. Die ebenfalls in der Tabelle 5 enthaltenen Messungsergebnisse lassen erkennen, daß das Verdiglobin$_{CN}$ eine katalytische Wirkung auf die Reaktion zwischen Hämoglobin und Chlorat nicht besitzt.

Zusammen mit dem Fehlen spektrophotometrischer Änderungen dürften die vorstehend beschriebenen Versuchsergebnisse es im höchsten Maße wahrscheinlich machen, daß Verdiglobin$_{CN}$ nicht mit Cyanid oder Azid u. a. eine Verbindung bildet entsprechend dem Hämiglobincyanid.

V. Darstellung des Verdoglobin$_{NO_2}$.

Durch systematische Änderung der wesentlichen die Bildung von Verdoglobin$_{NO_2}$ beeinflussenden Faktoren, nämlich der Konzentrationen von Hämiglobin, Nitrit, Wasserstoffperoxyd, Wasserstoffionen und der Temperatur, ergaben sich folgende Bedingungen als die günstigsten für die

[31] KIESE, M.: Biochem. Z. 316, 264 (1944).

Bildung von Verdoglobin$_{NO_2}$: Hämoglobin $3 \cdot 10^{-3}$ Äquivalente/l, Nitrit 0,15 Mol/l, Wasserstoffperoxyd $5—10 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, Wasserstoffionen $10^{-6,2}$ Mol/l, Phosphat 0,1 Mol/l. Als Reaktionstemperatur wurde Zimmertemperatur gewählt. Zwar konnte durch Erhöhung der Temperatur auf 40° die Reaktionsgeschwindigkeit so beschleunigt werden, daß die Reaktion in 3 Min. beendet war, doch wurde der Rest von unverändertem Hämoglobin dabei nicht merklich vermindert. Verringerung der Wasserstoffperoxydkonzentration unter $3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l — unter sonst gleichen Bedingungen — verlangsamte die Reaktion und verminderte die Ausbeute, während ihre Erhöhung über 10^{-2} Mol/l eine stark zunehmende Denaturierung des Proteins verursachte. Der Einfluß der Nitritkonzentration ist aus Tabelle 6 ersichtlich. Wasserstoffionen beschleunigen die Verdoglobinbildung. Unterhalb p_H 6 wird jedoch die Ausbeute an Verdoglobin wieder geringer und der durch Denaturierung ausfallende Anteil des Proteins wird größer. In der Tabelle 7 sind einige Messungen des Anteils an Verdoglobin enthalten, der bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen nach einer Stunde erreicht wurde. Durch kleine Mengen von Kupfersalzen, z. B. Kupfersulfat in einer Konzentration von etwa $5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l, wurde die Reaktion beschleunigt, während der Zusatz von Eisen-, Kobalt-, Cer- oder Mangansalzen ohne merklichen Einfluß war. Durch Zusatz von Kupfersulfat wurden die besten Ausbeuten erhalten, nämlich Umwandlungen von 95—96% des Hämoglobins. Die Gegenwart von Ferricyanid war ohne Einfluß auf die Bildung von Verdiglobin$_{NO_2}$, durch Cyanid wurde die Reaktion stark gehemmt. Wurde die Lösung nach Ablauf der verdoglobinbildenden Reaktion dialysiert und nachher erneut mit Nitrit und Wasserstoffperoxyd behandelt, so wurde damit keine weitere Umwandlung von Hämoglobin in Verdoglobin erreicht.

Tabelle 6. *Einfluß der Nitritkonzentration auf die Bildung von Verdoglobin$_{NO_2}$ durch Nitrit und Wasserstoffperoxyd.*

Hämoglobin $3 \cdot 10^{-3}$ Äquivalent/l
Wasserstoffperoxyd $5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, p_H 6,2
Reaktionsdauer 1 Stunde.

Nitrit Mol/l	Verdoglobin Äquivalent/l $\cdot 10^3$
0,008	1,3
0,025	2,0
0,075	2,50
0,15	2,75
0,30	2,75

Tabelle 7. *Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Bildung Verdoglobin$_{NO_2}$ durch Nitrit und Wasserstoffperoxyd.*

Hämoglobin $3 \cdot 10^{-3}$ Äquivalent/l
Wasserstoffperoxyd $5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l
Nitrit 0,15 Mol/l
Phosphat 0,1 Mol/l
Reaktionsdauer 1 Stunde.

p_H	Verdoglobin Äquivalent/l $\cdot 10^3$
6,0	2,8
6,75	2,6
7,3	2,2
7,7	1,9
8,5	1,4

In der oben erwähnten Zusammensetzung wurden meist Ansätze von insgesamt 14—15 ccm gemacht. Je nach Hämoglobingehalt wurden 2—3 ccm rote Zellen mit Wasser auf 10 ccm verdünnt. Nach der Hämo-

lyse wurden 2 ccm Phosphat und 2 ccm Nitrit 1,0 Mol/l zugesetzt und gleich danach unter kräftigem Umrühren 1 Tropfen Perhydrol Merck oder 0,5 bzw. 1 ccm einer entsprechend verdünnten Lösung von Wasserstoffperoxyd. Die Ansätze blieben 6—8 Stunden bei Zimmertemperatur unter gelegentlichem Umrühren stehen und wurden dann in Cellophanschläuchen mehrere Tage in der Kälte gegen fließendes Wasser dialysiert. In der Lösung, die durch Zentrifugieren von denaturiertem Protein befreit war, lag der grüne Farbstoff als Verdiglobin vor.

VI. Extinktionskonstanten des Verdoglobin$_{NO_2}$.

Zur Bestimmung der Extinktionskonstanten des Verdoglobin$_{NO_2}$ wurden Lösungen verwendet, die 5—10% des gesamten Globins als unverändertes Hämoglobin enthielten. Die Stammlösungen wurden mit 0,01 Mol/l Phosphatlösung von p_H 6,8 auf geeignete Konzentration verdünnt. Die in Abb. 2 dargestellten Extinktionskurven wurden nach dem Mittel von je 4 Messungen mit geringer Streuung gezeichnet. Die genauen Werte der Extinktionskonstanten sind in Tabelle 8 enthalten.

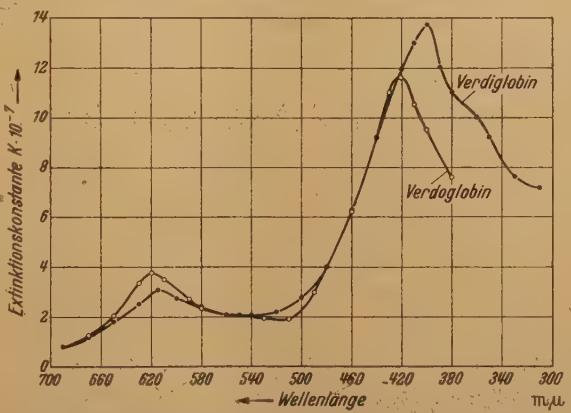


Abb. 2. Extinktion des Verdoglobin$_{NO_2}$ und Verdiglobin$_{NO_2}$; ○○○ Verdoglobin, ··· Verdiglobin. Abszisse: Wellenlänge in mμ, Ordinate: Extinktionskonstante, $K = \ln \frac{I_0}{I} \cdot \frac{1}{c} \cdot \frac{1}{d}$; c = Konzentration in Grammatom Fe/ccm; d = Schichte in cm.

Verdiglobin$_{NO_2}$ hat im roten Gebiet ein Maximum bei 615 mμ und Verdoglobin$_{NO_2}$ ein solches mit etwas größerer Extinktion bei 620 mμ. Havemanns[10] etwas abweichende Angaben bedürfen wohl einer Korrektur wie seine Daten über die Extinktion des Verdoglobin$_{CN}$ (Kiese und Kaeske[1]). Beide Formen des Farbstoffs haben wahrscheinlich ebenso wie Verdoglobin$_{CN}$ noch je ein schwach ausgeprägtes Maximum zwischen 600 und 550 mμ. Die Beimischung von Hämoglobin in den untersuchten Lösungen macht ihre genaue Bestimmung unmöglich.

Die Extinktion des Verdiglobins im blauen und violetten Gebiet ist erheblich geringer als die des Hämiglobins und auch geringer als die des Verdiglobin$_{CN}$. Die Extinktionskurve erhebt sich sehr allmählich zu einem wenig ausgeprägten Maximum bei 400 mμ. Im ultravioletten Gebiet zwischen 400 und 300 mμ ist die Extinktion erheblich größer als die des Hämiglobins.

Das durch Reduktion mit Dithionit aus dem Verdiglobin$_{NO_2}$ erhaltene Verdoglobin weist eine schmälere Extinktionsbande im blauen Gebiet auf mit einem Maximum bei 420 mμ. Die Extinktion im Maximum ist geringer als die des Verdiglobins$_{NO_2}$ bei 400 mμ.

Die Extinktionskurven des Verdiglobin$_{NO_2}$ und Verdoglobin$_{NO_2}$ sind denen des Hämiglobins und Hämoglobins weniger ähnlich als die der anderen Verdoglobine.

Tabelle 8. *Extinktionskonstanten des Verdiglobin$_{NO_2}$ und Verdoglobin$_{NO_2}$.*

$$K = \ln \frac{I_0}{I} \cdot \frac{1}{c} \cdot \frac{1}{d};$$

c Konzentration in Grammatom Fe/ccm
d Schichte in ccm.

Verdiglobin$_{NO_2}$		Verdoglobin$_{NO_2}$	
mμ	$K \cdot 10^{-7}$	mμ	$K \cdot 10^{-7}$
690	0,80	690	0,80
670	1,18	670	1,24
650	1,80	650	2,05
630	2,49	630	3,36
615	3,05	620	3,73
600	2,73	610	3,48
580	2,37	590	2,67
560	2,05	570	2,30
540	2,05	550	2,05
520	2,18	530	1,93
500	2,73	510	1,93
480	4,0	490	2,98
460	6,3	480	4,0
440	9,2	460	6,2
420	11,9	440	9,2
410	13,0	430	11,0
400	13,7	420	11,6
390	12,0	410	10,5
380	11,0	400	9,5
360	10,0	380	7,6
350	9,2		
330	7,6		
310	7,2		

VII. Reduktion des Verdoglobin$_{NO_2}$ zu Hämoglobin.

Die Oxydation von Hämoglobin zu Verdoglobin wurde von Wasserstoffionen in dem Sinne beeinflußt, daß mit steigender Wasserstoffionenkonzentration bis zu einer gewissen Grenze die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Verdoglobinbildung zunahm. Für eine Umkehr der Reaktion war dann niedrige Wasserstoffionenkonzentration als günstige Bedingung zu erwarten. Während bei neutraler oder saurer Reaktion das Verdoglobin$_{NO_2}$ in Gegenwart von Dithionit recht beständig war, wurde es in alkalischer Lösung langsam zu Hämoglobin reduziert. In Abb. 3 ist ein Versuch wiedergegeben, der die Reduktion des Verdoglobin$_{NO_2}$ zu Hämoglobin zeigt. Das Verdoglobin wurde in eine Lösung von 0,10 Mol Carbonat vom p_H 10 gebracht, und der Trog nach Zusatz von Dithionit ohne Zurücklassung von Luftblasen mit einem Gummistopfen fest verschlossen. Nach 12 Stunden bei Zimmertemperatur war ein großer Teil des Verdoglobins zu Hämoglobin reduziert. In weiteren 12 Stunden lief die Reaktion noch ein wenig weiter, während in den folgenden 36 Stunden keine meßbaren Veränderungen eintraten. Die Reaktion blieb bei einem Gemisch stehen, das noch einen leicht nachweisbaren Anteil von Verdoglobin enthielt. Wahrscheinlich war hier auch wieder ein Gleichgewicht erreicht, wie bei der umgekehrten Reaktion. Ebenso wie im roten

und grünen Gebiet trat bei der Reduktion auch im violetten Gebiet eine entsprechende Änderung der Extinktionen ein. Die Extinktion nahm zu, und das für das Hämoglobin charakteristische Maximum bei 429 mμ trat deutlicher hervor (Abb. 4). Aus der Extinktionskonstanten, die als Ordinate aufgetragen ist, ist ersichtlich, daß die Umwandlung keineswegs vollständig ist, denn Hämoglobin hat bei 430 mμ eine Extinktionskonstante von $K = 30 \cdot 10^7$. Das aus dem Verdoglobin$_{NO_2}$ erhaltene Hämoglobin unterschied sich in seiner Kohlenoxydverbindung nicht meßbar von Hämoglobin, das vorher nicht in Verdoglobin verwandelt war.

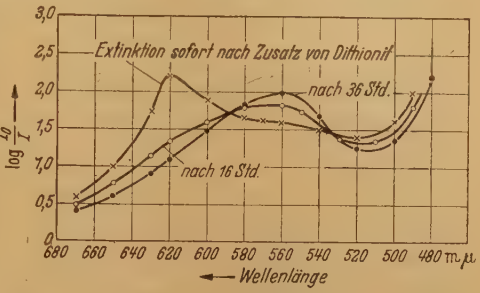


Abb. 3. Reduktion von Verdoglobin$_{NO_2}$ zu Hämoglobin. Verdoglobin 2,2 · 10^{-7} Äquivalent/ccm in Carbonat 0,1 mol p_H 10. ×××× Extinktion sofort nach Zusatz von Dithionit; ○○○ nach 16 Stunden; ··· nach 36 Stunden.

Schneller und vollständiger verlief die Reduktion des Verd$_{NO_2}$ zu Häm, wenn es nicht an Globin gebunden war in Form des Verdoglobins, sondern als Verdochromogen an eine organische Base. Die Reduktion des Pyridinverdochromogen$_{NO_2}$ durch Dithionit verlief schnell, aber auch nicht vollständig, sondern bis zu einem Rest Verdochromogen. Zur Durchführung der Reduktion wurde Verdoglobin$_{NO_2}$ in einer Konzentration von 2—3 · 10^{-4} Äquivalent in eine wäßrige Lösung von 20 ccm Pyridin in 100 ccm gebracht, im vollständig gefüllten Untersuchungstrog mit Dithionit reduziert, und der Trog sofort zum Ausschluß von Sauerstoff mit einem Gummistopfen verschlossen. Der Ablauf der Reduktion des Verdochromogens war beim Hydrazinverdochromogen leicht spektrophotometrisch zu verfolgen. Abb. 5 gibt den Verlauf der Reaktion wieder. Verdoglobin war in einer Konzentration von 2—3 · 10^{-4} Äquivalent/l in einer wäßrigen Lösung von 30 ccm Hydrazinhydrat in 100 ccm gelöst. Der Untersuchungstrog wurde mit der Lösung vollständig gefüllt und ohne Zurücklassung von Luft mit einem Gummistopfen verschlossen. Die Geschwindigkeit der Reduktion nahm mit dem Fortschreiten schnell ab (vgl. Kurve 1, 2 und 3, je 30 Min. Abstand) und blieb noch mehrere Stunden unter Erhaltung eines Restes von unverändertem Verdochromogen stehen.

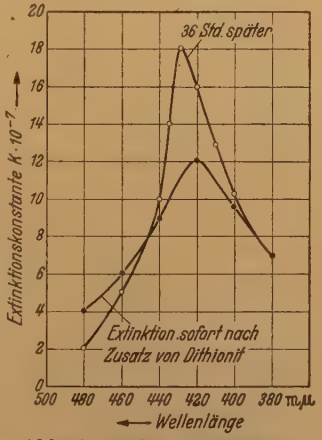


Abb. 4. Extinktionsänderung im violetten Gebiet bei der Reduktion von Verdoglobin$_{NO_2}$ zu Hämoglobin. Ordinate: Extinktionskonstante. ··· Extinktion sofort nach Zusatz von Dithionit. ○○○ 36 Stunden später.

Die Reduktion von Ammoniakverdochromogen$_{NO_2}$ zu Hämochromogen durch Dithionit verlief noch langsamer als die des Hydrazinverdochromogens. Somit sind auch für die Reduktion des Verds zu Häm Eigenschaften des Chromogenbildners von Bedeutung. Entsprechende Beziehungen sind für die Oxydation des Häms zu Verd ebenfalls bekannt[32].

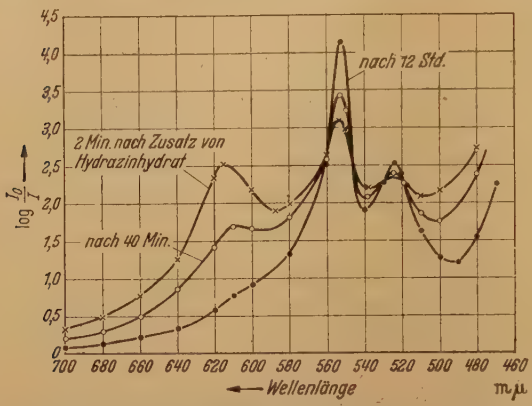


Abb. 5. Reduktion von Hydrazinverdochromogen$_{NO_2}$ zu Hydrazinhämochromogen. Verdoglobin$_{NO_2}$ in 50 % Hydrazinhydrat. ××× 2 Min. nach Zusatz von Hydrazinhydrat. ○○○ nach 40 Min. ··· nach 12 Stunden.

Aus den Extinktionskurven ist zu entnehmen, daß weder bei der Reduktion des Verdoglobins zu Hämoglobin noch bei der Reduktion des Verdochromogens zu Hämochromogen Verd ausschließlich in Häm übergeführt wird, vielmehr muß ein Teil des Verd in andere Verbindungen ohne charakteristische Extinktion übergehen.

Bindung des Verdoglobins an Kohlenoxyd verhinderte seine Reduktion zu Hämoglobin. In Karbonat vom p_H 10 wurde Kohlenoxydverdoglobin$_{NO_2}$ auch durch tagelange Einwirkung von Dithionit nicht verändert. Die Reduktion des Hydrazinverdochromogens zu Hämochromogen erfuhr durch Bindung des Verdochromogens an Kohlenoxyd eine erhebliche Verlangsamung.

VIII. Weitere Eigenschaften des Verdoglobin$_{NO_2}$.

Verdiglobin$_{NO_2}$ änderte seine Extinktion mit Änderung der Wasserstoffionenkonzentration im Bereich von p_H 5—10 nicht. Auch der Zusatz von Blausäure war ohne Einfluß auf die Extinktion. Es ist daher wahrscheinlich, daß das Verdiglobin im Bereich der genannten Wasserstoffionenkonzentrationen die Ladung seines Eisens nicht ändert und Blausäure nicht bindet.

Besonders hervorgehoben sei die in Abb. 5 wiedergegebene Extinktionskurve des Hydrazinverdochromogen$_{NO_2}$. Die Kurve besitzt ein Maximum bei 615 mμ. Die Kohlenoxydverbindung des Hydrazinverdochromogens hat ein Maximum ebenfalls bei 615 mμ. Die Lage des Maximums des Hydrazinverdochromogen$_{NO_2}$ bei 615 mμ ist bisher der einzige sichere Unterschied in der Extinktion des Verdoglobin$_{NO_2}$ und Verdoglobin$_S$. Dieses bildet — wie unten noch gezeigt wird — ein Hydrazinverdochromogen mit einem Maximum bei 605 mμ. Das Pyridinverdochromogen$_{NO_2}$ hatte im roten Gebiet ein Maximum bei 610 mμ.

[32] KIESE, M.: Naturw. **30**, 587 (1942).

IX. Darstellung des Verdoglobins.

Ausführliche schon früher erwähnte Messungen der Umsatzgeschwindigkeit der einzelnen Reaktionspartner haben gezeigt, daß die Reaktion von Hämoglobin mit Schwefelwasserstoff und Sauerstoff zu Schwefel und Verdoglobin$_S$ eine gekoppelte Reaktion ist in dem Sinne, daß einerseits der Schwefelwasserstoff die Oxydation des Hämoglobins zu Verdoglobin katalysiert und andererseits das Hämoglobin die Oxydation des Schwefelwasserstoffs zu Schwefel- und anderen Oxydationsprodukten beschleunigt[33]. Die Beschleunigung der Oxydation des Schwefelwasserstoffs ist durch den Anfall unter Umständen großer Mengen von elementarem Schwefel sinnfällig. Haurowitz[34] hat sie bereits manometrisch gemessen. Die Kopplung der Reaktionen ist aber nicht so fest, daß ein stöchiometrischer Umsatz erfolgte, vielmehr war das Verhältnis von oxydiertem Schwefelwasserstoff zu gebildetem Verdoglobin von den Konzentrationen der Reaktionspartner, besonders dem Verhältnis der Schwefelwasserstoffkonzentration zur Sauerstoffkonzentration abhängig. War der Sauerstoffdruck hoch (1500 mm Hg) im Verhältnis zum Schwefelwasserstoffdruck (500 mm Hg), so wurde schnell eine große Menge Schwefelwasserstoff oxydiert und schnell Verdoglobin$_S$ gebildet, dieses aber nur in geringer Menge. Höchstens die Hälfte des Hämoglobins wurde zu Verdoglobin oxydiert. Bei hohem Schwefelwasserstoffdruck (750 mm Hg) und niedrigem Sauerstoffdruck (15 mm Hg) verlief die Oxydation des Schwefelwasserstoffs wesentlich langsamer. Auch die Verdoglobinbildung verlief langsamer, doch wurde bei genügend langer Einwirkung eine weitere Umwandlung des Hämoglobins in Verdoglobin erreicht als durch gleich lange Behandlung mit Schwefelwasserstoff und hohem Sauerstoffdruck. Unter der Einwirkung hohen Schwefelwasserstoff- und Sauerstoffdrucks wurde Verdoglobin auch in beträchtlichem Umfange zerstört.

Wasserstoffionen begünstigten bis zu einer Konzentration von 10^{-6} Mol/l die Bildung des Verdoglobin$_S$ ebenso wie die der anderen Verdoglobine.

Als Produkt der Reaktion von Hämoglobin mit Schwefelwasserstoff und Sauerstoff wurde regelmäßig neben Verdoglobin$_S$ Hämiglobinsulfid erhalten. Das gesamte Hämoglobin, das nicht in Verdoglobin verwandelt war, lag in dieser Form vor. Es mußte also in einer Nebenreaktion Hämoglobin zu Hämiglobin oxydiert worden sein, das dann mit dem Schwefelwasserstoff Hämiglobinsulfid bildete. Eine Verbesserung der Ausbeute an Verdoglobin$_S$ erschien möglich, wenn die verdoglobinbildende Reaktion gegenüber dieser Nebenreaktion beschleunigt werden konnte. Zusatz von Hydroxylaminchlorid beschleunigte die Verdoglobinbildung stark, ohne allerdings die Ausbeute wesentlich zu verbessern.

[33] Die Protokolle dieser Untersuchungen sind zur Zeit nicht zugänglich und werden später veröffentlicht werden. — [34] Haurowitz, F.: Enzymologia (Nd.) **10**, 141 (1941).

Die spektrophotometrische Verfolgung der Umwandlung von Hämoglobin in Verdoglobin ergab einen weiteren Hinweis darauf, daß diese Reaktion zu einem Gleichgewicht führt (Abb. 6). Wurde in eine Lösung von 0,5 g Hämoglobin/100 ccm vom p_H 6,3 Schwefelwasserstoff eingeleitet, so entwickelte sich schnell die Bande des Verdoglobins im roten Gebiet, während die Extinktion bei 550 mμ abnahm. Die Extinktionskurven der Gemische bildeten zwei Schnittpunkte bei 580 und 535 mμ. Die Verdoglobinbildung verlangsamte schon nach 10 Min. sehr stark. Später erst traten dann die beiden Maxima des Hämiglobinsulfids im grünen Gebiet hervor.

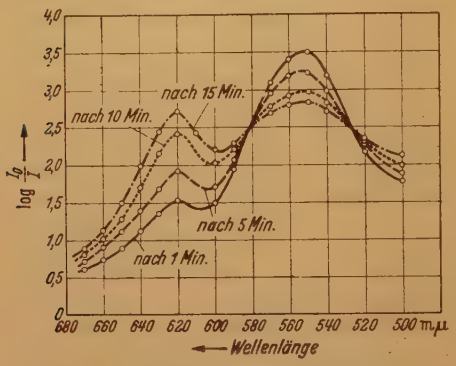


Abb. 6. Umwandlung von Hämoglobin in Verdoglobin$_S$ durch Schwefelwasserstoff und Sauerstoff. Hämoglobin $3 \cdot 10^{-7}$ Äquivalent je ccm in Phosphat 0,05 mol p_H 6,2. Schichte 1 cm. Schwefelwasserstoff eingeleitet und verschlossen. Temp. 16°. Kurve 1 nach 1 Min., Kurve 2 nach 5 Min., Kurve 3 nach 10 Min., Kurve 4 nach 15 Min.

Eine Verbesserung der Ausbeute an Verdoglobin erschien unter diesen Bedingungen nur noch möglich durch Verstärkung der oxydierenden Wirkung. Wasserstoffperoxyd und andere Peroxyde wurden als Oxydationsmittel genannt, die in Gegenwart von Schwefelwasserstoff aus Hämoglobin Verdoglobin bilden (MICHEL[7]). Wie weiter unten gezeigt wird, entsteht jedoch bei der Oxydation von Hämoglobin durch Wasserstoffperoxyd in Gegenwart von Schwefelwasserstoff nicht Verdoglobin$_S$, sondern Verdoglobin$_{CN}$.

Eine allzu lange Behandlung des Gemisches von Hämoglobin und Verdoglobin, insbesondere mit hohen Sauerstoffdrucken, führte zu weiteren Veränderungen des Verdoglobins, die sich in der Entwicklung einer Erhebung der Extinktionskurve um 640 mμ manifestiert und schließlich zu einer Zerstörung des Verdoglobins führt.

Als Verfahren zur Darstellung des Verdoglobin$_S$, d. h. eines Gemisches von Verdoglobin$_S$ mit möglichst wenig Hämiglobin wurde schließlich folgendes benutzt: 2,5 ccm rote Zellen wurden in ein schlankes Standgefäß von 150 ccm Inhalt gegeben und mit 7,5 ccm Wasser hämolysiert. Nach Zusatz von 2 ccm Phosphat 1,0 Mol/l p_H 6,2 wurde das Gefäß mit einem Gummistopfen, der von einem Hahn durchbohrt war, fest verschlossen. An der inneren Seite des Gummistopfens war eine kleine Glasschale befestigt zur Aufnahme von Hydroxylamin oder anderen Zusätzen, die nach Herstellung der gewünschten Gasmischung der Lösung zugesetzt werden sollten. Das Gefäß wurde nun zur Entfernung des Sauerstoffs evakuiert und danach Schwefelwasserstoff bis zu einem Druck von 760 mm

Hg eingelassen. Schließlich wurde noch Sauerstoff mit einem Partialdruck von 15 mm Hg zugesetzt. Nach kurzem Durchmischen wurden 40 bis 50 mg Hydroxylaminhydrochlorid, die vorher in die kleine Schale eingewogen waren, in die Lösung eingekippt. Unter langsamem Rotieren des Gefäßes konnte die Reaktion dann 12 Stunden lang ablaufen. Danach wurde wieder evakuiert und für 12—24 Stunden nur Schwefelwasserstoff zur Reduktion des Hämiglobins in das Gefäß eingelassen. Nunmehr wurde wieder evakuiert und das Gefäß kurz geöffnet zur Füllung der Schale mit Hydroxylamin. Die ganze Operation zur Oxydation des Hämoglobins wurde anschließend noch zweimal wiederholt. Nach der letzten Oxydation wurde der Schwefelwasserstoff wieder durch Evakuierung entfernt und die Lösung zur Dialyse angesetzt. Wenig denaturiertes Protein und elementarer Schwefel wurden schließlich durch Zentrifugieren abgetrennt. Die Lösung enthielt etwa 5 g Globin in 100 ccm, davon etwa 80% als Verdoglobin$_S$, den Rest als Hämiglobin.

X. Bildung von Verdoglobin$_S$ durch Arsenwasserstoff und Sauerstoff.

Die gekoppelte Oxydation von Hämoglobin und Schwefelwasserstoff liefert Verdoglobin nur in mäßiger Ausbeute, wie eben dargelegt wurde. Ein anderer Weg, der eine vollständigere Überführung des Hämoglobins in Verdoglobin$_S$ ermöglichte, ist bisher nicht bekannt. Es ist aber für unsere Vorstellungen vom Bau des Verdoglobin$_S$ von großem Wert, daß es überhaupt möglich ist, dieses Verdoglobin auch ohne die Anwendung von Schwefelwasserstoff oder einer anderen Schwefelverbindung zu erzeugen, wenn auch in weit schlechterer Ausbeute als mit Schwefelwasserstoff und Sauerstoff. Eine solche Reaktion ist die Umsetzung von Hämoglobin mit Arsenwasserstoff und Sauerstoff, eine andere die Umsetzung von Hämoglobin mit Hydroxylamin und Sauerstoff.

Das Eintreten grüner Verfärbung bei der Behandlung von Hämoglobin mit Arsenwasserstoff in Gegenwart von Sauerstoff war bereits Meissner[35] aufgefallen, aber das Verdoglobin war bisher noch nicht identifiziert worden. Jung[36] fand eine Zunahme des „leicht abspaltbaren Eisens" nach dem Einwirken von Arsenwasserstoff auf Oxyhämoglobin, was ebenfalls auf Verdoglobinbildung hinwies. Wir haben Verdoglobin$_S$ nicht nur bei der Einwirkung von Arsenwasserstoff auf sauerstoffhaltiges Blut in vitro beobachtet, sondern auch in vivo bei akuten Arsenwasserstoffvergiftungen. Wenn durch entsprechend hohe Konzentration von Arsenwasserstoff der Tod in einer halben bis einer Stunde eintrat, wurde im Blut von Katzen Verdoglobin$_S$ in einer Konzentration von 2—3 g/100 ccm gefunden. In vitro verlief die Bildung des Verdoglobins am günstigsten, wenn ähnlich wie bei der Umsetzung mit Schwefelwasserstoff die Konzentration des

[35] Meissner, R.: Z. exper. Path. u. Ther. **13**, 284 (1913). — [36] Jung, F.: Biochem. Z. **302**, 294 (1939).

Arsenwasserstoffs hoch und die des Sauerstoffs niedrig war. Es wurde ebenso verfahren wie im vorigen Abschnitt für die Darstellung von Verdoglobin$_S$ beschrieben, mit dem Unterschied, daß Arsenwasserstoff statt Schwefelwasserstoff verwendet und Hydroxylamin fortgelassen wurde. Das Verdoglobin wurde durch folgende Daten als Verdoglobin$_S$ identifiziert: Das Verdoglobin mit einem Extinktionsmaximum bei 620 mμ, dessen Kohlenoxydverbindung mit stärkerer Extinktion und dem Maximum bei 615 mμ, ferner das Hydrazinverdochromogen mit einem Extinktionsmaximum bei 605 mμ und dessen Kohlenoxydverbindung mit einem Maximum bei 615 mμ.

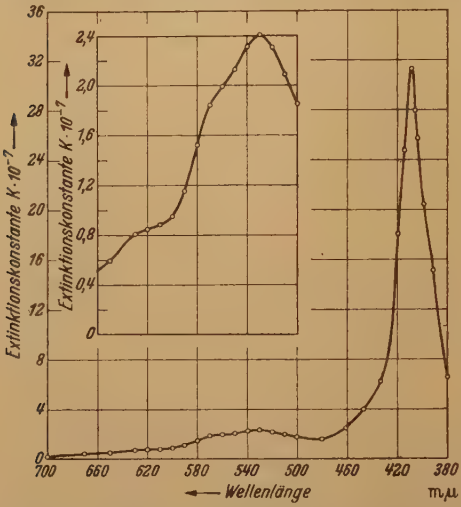


Abb. 7. Extinktion des Hämiglobin-Hydroxylamins. Abszisse: Wellenlänge in mμ. Ordinate: Extinktionskonstante $K = \ln \frac{I_0}{I} \cdot \frac{1}{c} \cdot \frac{1}{d}$; c Konzentration in Grammatom Fe/ccm, d Schichte in cm. Im Einsatz: Extinktionskurve zwischen 760 und 500 mμ mit 10fach vergrößerter Ordinate.

XI. Die Umsetzung des Hydroxylamins mit Hämoglobin.

Es ist bekannt, daß Hydroxylamin in vitro und in vivo in Gegenwart von Sauerstoff Hämoglobin zu Hämiglobin oxydiert[37, 38, 39, 40], und daß es in vivo Verdoglobin zu bilden vermag[1]. Beim Hunde wurde nach Injektion von 50 mg/kg Hydroxylaminchlorid nach einer Stunde eine Konzentration von 1,2 g Verdoglobin in 100 ccm Blut erreicht.

In vitro verliefen die Umsetzungen des Hydroxylamins mit Hämoglobin bei p_H 6,8 verhältnismäßig langsam. Freilich war die Geschwindigkeit der Bildung von Hämiglobin von der Konzentration des Hydroxylamins abhängig. Jedoch verlief die Oxydation langsamer als durch Nitrit in gleicher Konzentration. Andererseits wurde die Oxydation des Hämoglobins zu Hämiglobin durch Verminderung der H^+-Konzentration (Karbonat vom p_H 10) stark beschleunigt.

Wurde dem Hämiglobin in saurer Lösung ein großer Überschuß von Hydroxylamin zugefügt, so bildete sich eine neue Verbindung: Hämiglobin-Hydroxylamin. Ihre Extinktion ist in Abb. 7 wiedergegeben. Die Extinktionskonstanten sind im einzelnen in Tabelle 9 enthalten. Die

[37] BINZ, C.: Virchows Arch. **113**, 1 (1888). — [38] LEWIN, L.: Arch. exper. Path. (D.) **25**, 306 (1889). — [39] LETSCHE, E.: Z. physiol. Chem. **80**, 412 (1912). — [40] HEUBNER, W.: Arch. exper. Path. (D.) **72**, 239 (1913).

Tabelle 9. *Extinktionskonstanten des Hämiglobin-Hydroxylamins.*

$$K = \ln \frac{I_0}{I} \cdot \frac{1}{c} \cdot \frac{1}{d},$$

c = Konzentration in Grammatom Fe/ccm, d = Schichte in cm.

λ mμ	$K \cdot 10^{-7}$	λ mμ	$K \cdot 10^{-7}$	λ mμ	$K \cdot 10^{-7}$
700	0,21	560	2,0	432	6,1
670	0,43	550	2,1	420	18,0
650	0,60	540	2,3	414	24,9
630	0,82	530	2,4	409	31,2
620	0,85	520	2,3	406	28,0
610	0,89	510	2,1	404	25,8
600	0,96	500	1,9	399	20,5
590	1,2	480	1,7	389	15,2
580	1,5	460	2,5	379	6,5
570	1,9	446	3,9		

Verbindung hat ebenso wie das Hämiglobin ein Extinktionsmaximum bei 630 mμ; aber mit einer etwas geringeren Extinktion. Ein wenig ausgeprägtes Maximum ist zwischen 560 und 570 mμ und ein weiteres um 530 mμ gelegen. Die SORET-Bande der Verbindung hat ihr Maximum bei 409 mμ mit einer Extinktionskonstanten von $K = 3{,}12 \cdot 10^8$. Die Extinktion dieser Verbindung war im sichtbaren Gebiet nur schwierig von der des Hämiglobinnitrits[17, 15, 18] zu unterscheiden. Im violetten und ultravioletten Gebiet sind die Extinktionen nicht vergleichbar, da Nitrit selbst bei 405 mμ eine Extinktionskonstante von $K = 0{,}07 \cdot 10^4$ und bei 365 mμ von $K = 6 \cdot 10^4$ (Konzentration in Mol/ccm) hat. Die beiden wenig scharfen Maxima im grünen Gebiet liegen beim Hämiglobinnitrit offenbar wenige mμ weiter im langwelligen Gebiet. Die Dissoziationskonstante des Hämiglobin-Hydroxylamins ist weit größer als die des Hämiglobinnitrits, nämlich etwa $K' = 0{,}02$ bei p_H 6—8 gegenüber $K' = 0{,}003$ für Hämiglobinnitrit. Genaue Messungen der Konstanten werden übrigens besonders beim Hämiglobin-Hydroxylamin durch weitere Veränderungen dieser Verbindung gestört.

Die Identität der beiden beim Zusatz von Nitrit bzw. Hydroxylamin gebildeten Verbindungen war auszuschließen. Selbst wenn durch Umsetzung mit dem Hämiglobin in der Nitritlösung Hydroxylamin oder in der Hydroxylaminlösung Nitrit gebildet würde, könnte es keine höhere Konzentration erreichen, da sich Hydroxylamin und Nitrit zu Wasser und Stickstoffoxydul umsetzen. Daß in der Lösung von Hämiglobin und Hydroxylamin keine beachtenswerten Konzentrationen von Nitrit auftreten, wurde durch die Reduktion des Gemisches mit Dithionit bestätigt. Während Hämiglobin mit Nitrit durch Reduktion Stickoxydhämoglobin bildete, wurde das Hämiglobin im Gemisch mit Hydroxylamin durch Reduktion mit Dithionit in freies Hämoglobin übergeführt. Hydroxylamin bildete auch mit Hämatin eine Verbindung. In stark

alkalischer Lösung hatte sie eine breite Bande im grünen Gebiet mit einem Maximum bei 550 mμ.

Die Verbindung des Hämiglobins mit Hydroxylamin war nicht beständig. In dem Gemisch von Hämiglobin und Hydroxylamin liefen weitere Reaktionen ab. Eine Reduktion des Hämiglobins entsprechend der von Ferriionen in saurer Lösung[41] wurde nicht beobachtet. Wie LIPSCHITZ und WEBER[42] gefunden haben, katalysiert Hämiglobin den Zerfall von Hydroxylamin zu Stickstoff und Ammoniak, was Eisen in stark alkalischer Lösung ebenfalls tut[43]. Dadurch wird die Hydroxylaminkonzentration vermindert. Entweder im Zusammenhang mit dieser Oxydoreduktion oder durch weitere Reaktionen wurde ein Teil des Hämoglobins in Verdoglobins übergeführt. Ferner wurde ein Teil des Globins denaturiert und fiel aus.

Um das durch Hydroxylamin gebildete Verdoglobin in möglichst hoher Konzentration im Vergleich zur Konzentration des Hämiglobins zu erhalten, wurden Hämoglobinlösungen vom p_H 6,2 wiederholt mit Hydroxylaminhydrochlorid ersetzt. Dazu wurden 2,5 ccm rote Zellen vom Rinde mit 7,5 ccm Wasser hämolysiert, 2 ccm Phosphat 1,0 Mol/l p_H 6,2 zugefügt und im Laufe von 12—24 Stunden dreimal je 70—100 mg Hydroxylaminhydrochlorid zugesetzt. Ausgefälltes Protein wurde durch Zentrifugieren abgetrennt. Die Lösung enthielt das Verdoglobin neben viel Hämiglobin. Wurde die starke Extinktion des Hämiglobins im roten Gebiet durch Reduktion beseitigt, so war das Verdoglobin mit einem Extinktionsmaximum bei 620 mμ erkennbar. Die Kohlenoxydverbindung hatte ihr Maximum bei 615 mμ, das Hydrazinverdochromogen etwa bei 605 mμ und das Kohlenoxydverdohämochromogen bei 615 mμ. Diese Daten stimmten mit denen des Verdoglobins überein.

Im Gegensatz zum Hämiglobinnitrit ließ sich Hämiglobin-Hydroxylamin nur sehr wenig mit Wasserstoffperoxyd zu Verdoglobin oxydieren.

XII. Einfluß des Hydroxylamins auf die Verdoglobinbildung durch Schwefelwasserstoff und Sauerstoff.

Zur Darstellung von Verdoglobins wurde die beschleunigende Wirkung des Hydroxylamins herangezogen und bei der Beschreibung auch erwähnt. LEWIN[38] hatte bereits beobachtet, daß in einer Lösung von Blut und Schwefelwasserstoff die Bande des Verdoglobins stärker hervortritt, wenn dem Gemisch Hydroxylamin zugesetzt wird. Er nahm allerdings an, daß es sich dabei um eine Addition der Extinktion des Verdoglobins und der des durch Hydroxylamin gebildeten Hämiglobins handle. Tatsächlich trat jedoch durch den Zusatz von Hydroxylamin eine Beschleunigung der

[41] KURTENACKER, A. u. R. NEUSSER: Z. anorg. Chem. **131**, 39 (1923). — [42] LIPSCHITZ, W. u. J. WEBER: Z. physiol. Chem. **132**, 251 (1923). — [43] KURTENACKER, A. u. F. WENGEFELD: Z. anorg. Chem. **140**, 315 (1924).

Bildung von Verdoglobin$_S$ ein. Diese entsprach nicht etwa nur der Verdoglobinbildung durch Hydroxylamin selbst. Es ist aber auch nicht möglich, den Einfluß katalytisch zu nennen im strengen Sinne einer katalytischen Wirkung.

Wurde in eine Lösung von Hämoglobin, Sauerstoff und Schwefelwasserstoff Hydroxylamin hineingegeben, so trat nach wenigen Sekunden eine tief dunkelgrüne Verfärbung ein. Später nahm die Lösung eine hellere Farbe an, so daß man die Bildung einer Zwischenverbindung unbekannter Natur annehmen möchte, die in das Verdoglobin übergeht.

Nitrit beeinflußte die Reaktion zwischen Hämoglobin, Schwefelwasserstoff und Sauerstoff nicht in gleicher Weise wie Hydroxylamin. Vielmehr bildete Nitrit in dem Gemisch nur Hämiglobin, das weiter mit Schwefelwasserstoff unter Bildung von Hämiglobinsulfid reagierte. Die rote Lösung blieb lange Zeit unverändert.

XIII. Extinktionskonstanten des Verdoglobin$_S$.

Die Extinktion des Verdoglobin$_S$ mußte aus Messungen errechnet werden, die an Gemischen von etwa 80% Verdoglobin und 20% Hämiglobin bzw. Hämoglobin gemacht worden waren. Die aus verschiedenen Messungen errechneten Werte zeigten nur geringe Abweichungen. Für das Verdoglobin ergaben sich die gleichen Extinktionskonstanten, wenn von der hämiglobinhaltigen Lösung die Extinktion des Hämiglobins wie wenn nach Reduktion mit Dithionit die Extinktion des Hämoglobins abgezogen wurde. Das bedeutet, daß in der nach der Dialyse erhaltenen Lösung Verdoglobin mit zweiwertigem Eisen vorlag. Es zeigt ferner, daß das Verfahren zur Elimination der Extinktion des Hämiglobins bzw. Hämoglobins korrekt war. Allerdings konnte die Extinktion im Gebiet von 500—600 mμ nicht genügend genau ermittelt werden, um zu entscheiden, ob hier noch eine eben erkennbare Bande vorhanden ist wie beim Verdoglobin$_{CN}$. Die Bande im roten Gebiet hat ihr Maximum bei 620 mμ mit einer nur wenig kleineren Extinktionskonstanten als die der beiden anderen Verdoglobine. Die SORET-Bande im violetten Gebiet ist schmal mit einem scharf ausgeprägten Extinktionsmaximum bei 420 mμ und einer Extinktionskonstanten von $K = 14 \cdot 10^7$. Diese ist wenig größer als die des Verdoglobin$_{NO_2}$ und erheblich kleiner als die des Verdoglobin$_{CN}$. Zwischen 400 und 300 mμ ist die Extinktion noch verhältnismäßig hoch, $K = 6 - 7 \cdot 10^7$, und fällt unterhalb 300 mμ ab. In Abb. 8 ist die Extinktionskurve des Verdoglobin$_S$ für den Bereich von 300—700 mμ wiedergegeben. Die Werte der Extinktionskonstanten sind aus Tabelle 10 zu entnehmen.

Der hier mitgeteilte Wert der Extinktionskonstanten bei 620 mμ ist etwas höher als der aus den von DRABKIN und AUSTIN[6] extrapolierten Werten errechenbare, der sich zu $K = 2{,}5 \cdot 10^7$ ergibt. Der Wert von

Tabelle 10. *Extinktionskonstanten des Verdoglobin$_S$.*

$$K = \ln \frac{I_0}{I} \cdot \frac{1}{c} \cdot \frac{1}{d},$$

c = Konzentration in Grammatom Fe/ccm, d = Schichte in cm.

λ mμ	$K \cdot 10^{-7}$	λ mμ	$K \cdot 10^{-7}$	λ mμ	$K \cdot 10^{-7}$
670	0,90	530	1,74	410	10,0
650	1,44	510	1,80	390	7,0
630	2,40	490	1,92	370	6,5
620	2,88	470	2,4	350	6,2
610	2,64	460	3,4	330	6,0
590	2,04	440	7,0	310	5,2
570	1,80	430	11,3	290	4,0
550	1,68	420	14,0		

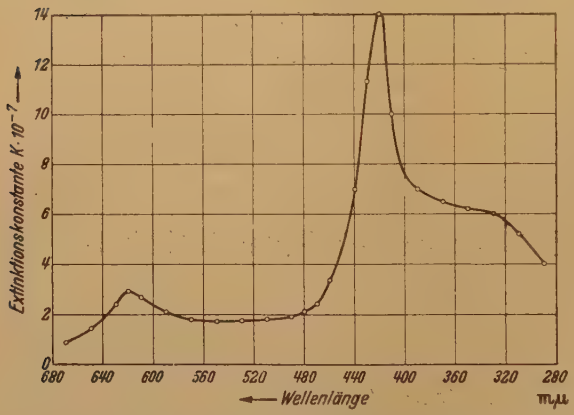


Abb. 8. Extinktion des Verdoglobin$_S$. Abszisse: Wellenlänge in mμ. Ordinate: Extinktionskonstante $K = \ln \frac{I_0}{I} \cdot \frac{1}{c} \cdot \frac{1}{d}$; c Konzentration in Grammatom Fe/ccm, d Schichte in cm.

DRABKIN und AUSTIN ist somit nur um 15% zu niedrig und nicht, wie wir früher annahmen[44], um 30%.

XIV. Reduktion des Verd$_S$ zu Häm.

Die Reduktion des Verdoglobin$_S$ zu Hämoglobin in Karbonat vom p_H 10 gelang nicht ebenso einwandfrei wie die des Vordoglobin$_{NO_2}$. Im Laufe der langsamen Reaktion wurde Hämochromogen gebildet, und es war nicht sicher zu entscheiden, ob dieses aus dem Verdoglobin entstand oder aus dem noch vorhandenen Hämoglobin. Dagegen war wie mit Verd$_{NO_2}$ die Reduktion des Verdochromogens zu Hämochromogen durch Hydrazinhydrat durchführbar. Die Extinktionsänderungen waren ähnlich den in Abb. 5 wiedergegebenen nur nicht so ausgeprägt. Die Reduktion in 30%iger Hydrazinhydratlösung verlief langsamer als die des Verdochromogen$_{NO_2}$, sie kam auch früher zum Stillstand als diese. Die Extinktion bei 605 mμ nahm ab, und die bei 551 nahm zu. Nach etwa 4 Stunden trat eine allmählich fortschreitende allgemeine Extinktionsabnahme ein. Weitere Umwandlung von Verd in Häm war darin nicht erkennbar. Die Lage der α-Bande des entstehenden Hämochromogens bei 551 mμ weist darauf hin, daß auch aus dem Verdochromogen$_S$ wahrscheinlich nicht Protohämochromogen, sondern ein nahe verwandtes gebildet wurde.

[44] GAEDE, D. u. M. KIESE: Klin. Wschr. **1944**, 92.

Zusatz von Hydroxylamin zur Lösung des Hydrazinverdochromogens beschleunigte die Abnahme der Extinktion bei 605 mμ. Doch war nicht klar zu erkennen, ob tatsächlich eine entsprechend schnellere Bildung von Häm stattfand, da das Hydroxylamin das Hydrazinhämochromogen langsam in Häm-Hydroxylamin überführte.

XV. Bildung von Verdoglobin durch Einwirkung von Schwefelwasserstoff und Wasserstoffperoxyd.

Michel[7] hatte beschrieben, daß die Bildung von Verdoglobin$_S$ durch Einwirkung von Schwefelwasserstoff und Sauerstoff auf Hämoglobin durch Zusatz von Wasserstoffperoxyd beschleunigt würde, und nahm an, daß die Peroxydbildung wesentlich für die Bildung des Verdoglobins wäre. Die eigenen Untersuchungen über die gekoppelte Reaktion von Hämoglobin und Schwefelwasserstoff mit Sauerstoff sowie über Bildung anderer Verdoglobine machte eine Nachprüfung dieser Angaben erforderlich. Um die Einwirkung von Wasserstoffperoxyd auf Hämoglobin in Gegenwart von Schwefelwasserstoff zu prüfen, mußte die Reaktion von Sauerstoff mit Hämoglobin und Schwefelwasserstoff ausgeschlossen werden.

In einem geschlossenen Gefäß mit Zu- und Ableitungsrohr, einem gasdicht eingeführten Rührer und einer ebenfalls gasdicht eingesetzten Bürette wurden 130 ccm einer Lösung von 10 g Hämoglobin in 100 ccm Phosphat 0,05 Mol/l p_H 6,0 vom Sauerstoff befreit, indem Kohlendioxyd unter Rühren der Lösung 15 Min. lang durch das Gefäß geleitet wurde. Um Schaumbildung zu vermeiden, wurde die Lösung nur gerührt und nicht vom Gase durchperlt; das Einleitungsrohr endete unmittelbar über der Lösung. Danach wurde ein starker Schwefelwasserstoffstrom durchgeleitet, um etwa auftretenden Sauerstoff sofort zu entfernen, und dabei langsam aus der Bürette eine Lösung von 3 g Wasserstoffperoxyd in 100 ccm zugetropft. Nachdem 40 ccm eingetropft waren, wurde noch etwa 3 Stunden Schwefelwasserstoff durchgeleitet und schließlich der Schwefelwasserstoff durch einen Kohlendioxydstrom ausgewaschen. Ein kleiner Niederschlag wurde durch Zentrifugieren abgetrennt.

Die so erhaltene Lösung hatte in geeigneter Verdünnung die in Abb. 9 wiedergegebene Extinktion: eine Bande bei 637 mμ und zwei weitere bei 578 und 540 mμ. Diese kamen unverändertem Oxyhämoglobin zu, denn durch Einleitung von Kohlenoxyd wurde die Bande von 578 mμ nach 572 mμ verschoben. Das Maximum bei 637 mμ wurde durch die Einleitung von Kohlenoxyd nicht verändert. Wurde nun in Gegenwart von Kohlenoxyd mit Dithionit reduziert, so nahm die Extinktion im roten Gebiet stark zu und das Maximum wanderte nach 627 mμ. Durch die Behandlung mit Wasserstoffperoxyd in Gegenwart von Schwefelwasserstoff war also das Eisen im Hämoglobin nicht oxydiert worden, wohl aber war Verdiglobin gebildet worden, das erst nach Reduktion zu Verdoglobin Kohlenoxyd zu binden vermochte. Reduktion des Verdiglobins ohne

Kohlenoxyd erhöhte die Extinktion im roten Gebiet ebenfalls. Das Extinktionsmaximum des Verdoglobins lag bei 630 mμ. Zur weiteren Charakterisierung wurden Pyridin- und Hydrazinverdochromogen sowie deren Kohlenoxydverbindungen gebildet. Die beobachteten Extinktionsmaxima hatten folgende Lage: Pyridinverdichromogen 615 mμ, Pyridinverdochromogen 618 mμ, Kohlenoxydpyridinverdochromogen 630 mμ, Hydrazinverdochromogen 615 mμ und Kohlenoxydhydrazinverdochromogen 627 mμ.

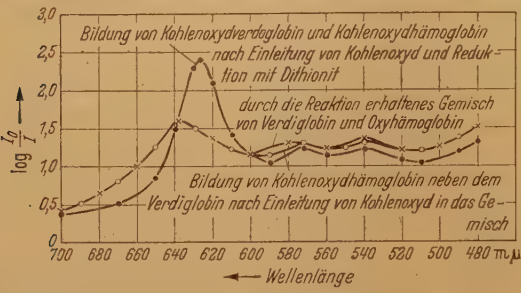


Abb. 9. Verdoglobin gebildet durch Einwirkung von Schwefelwasserstoff und Wasserstoffperoxyd auf Hämoglobin unter Ausschluß von Sauerstoff. ××× Durch die Reaktion erhaltenes Gemisch von Verdiglobin und Oxyhämoglobin. °°° Bildung von Kohlenoxydhämoglobin neben Verdiglobin nach Einleitung von Kohlenoxyd in das Gemisch. ··· Bildung von Kohlenoxydverdoglobin und Kohlenoxydhämoglobin nach Einleitung von Kohlenoxyd und Reduktion mit Dithionit.

Keine der Verbindungen des Verdoglobins hatte eine Bande an gleicher Stelle wie eine entsprechende Verbindung des Verdoglobin$_S$. Mit Ausnahme des Verdiglobins und des Pyridinverdichromogen$_S$ stimmten aber alle Verbindungen mit denen des Verdoglobin$_{CN}$ überein.

Das durch die Einwirkung von Wasserstoffperoxyd und Schwefelwasserstoff gebildete Verdoglobin war also ganz sicher kein Verdoglobin$_S$, sondern dem Verdoglobin$_{CN}$ nahe verwandt oder gar mit ihm identisch und die Abweichungen in der Extinktion des Verdiglobins und Pyridinverdichromogens durch Nebenbedingungen verursacht.

Wurde der Sauerstoff bei der Einwirkung von Wasserstoffperoxyd und Schwefelwasserstoff auf Hämoglobin nicht vollständig ausgeschlossen, so wurden Gemische von Verdoglobin$_S$ und Verdoglobin$_{CN}$ erhalten. Solch ein Gemisch wurde z. B. in folgendem Ansatz erhalten: 2,5 ccm rote Zellen vom Rinde mit 7,5 ccm Wasser hämolysiert und 2 ccm Phosphat 1,0 Mol/l p_H 6,2 zugesetzt. Das Gemisch wurde kurze Zeit evakuiert, so daß der größte Teil des Sauerstoffs, aber nicht der gesamte, entfernt wurde. Dann wurde Schwefelwasserstoff bis zu einem Druck von etwa 760 mm Hg eingelassen und aus dem Einsatz ein Tropfen Perhydrol eingekippt. Nach einer Stunde wurde wieder evakuiert. Das Gemisch zeigte eine breite Bande zwischen 600 und 650 mμ, bedingt durch die beiden Extinktionsmaxima bei 637 und 620 mμ. Die Extinktion der Kohlenoxydverbindungen ließ neben dem Maximum des Kohlenoxydverdoglobin$_{CN}$ bei 627 mμ das des Kohlenoxydverdoglobin$_S$ bei 615 mμ erkennen.

Ebenso waren in der Extinktion der Hydrazinchromogene zwei Maxima nachweisbar, nämlich bei 615 mμ das des Hydrazinverdochromogen$_{CN}$ und bei 605 mμ das des Verdochromogen$_S$.

Die Zugabe einer größeren Menge von Wasserstoffperoxyd zu der sauerstofffreien Lösung von Hämoglobin und Schwefelwasserstoff, als oben angegeben, machte die Umwandlung des Hämoglobins in Verdoglobin nicht vollständiger, sondern zerstörte bereits wieder Verdoglobin. Schließlich wurde eine braune Lösung erhalten, in der kein Häm und kein Verd mehr nachweisbar waren. Eine sehr stabile Lösung kolloiden Schwefels war gebildet worden, die sich auch nach 10tägiger Dialyse nicht merklich verändert hatte.

Zusammenfassung.

Die Bildungsreaktionen dreier Verdoglobine wurden untersucht und einige Eigenschaften der Verdoglobine beschrieben.

Die Umwandlung von Hämoglobin zu Verdoglobin gelang nur beim $Verdoglobin_{CN}$ bis auf einen Rest von weniger als 3% unveränderten Hämoglobins. Beim $Verdoglobin_{NO_2}$ wurde eine Umwandlung bis auf 5—10% Hämoglobin erreicht, und $Verdoglobin_S$ wurde nur mit Verunreinigungen von etwa 20% Hämoglobin erhalten.

Es wurde angenommen, daß die Bildungsreaktionen zu einem Gleichgewicht führen, zumal auch $Verdoglobin_{NO_2}$, weniger $Verdoglobin_S$ und gar nicht $Verdoglobin_{CN}$ wieder zu Hämoglobin reduziert werden konnte. Während die Oxydation des Hämoglobins zu Verdoglobin bei p_H 6 am günstigsten verlief, war die Reduktion des Verdoglobins zu Hämoglobin nur in alkalischer Lösung, p_H 10, möglich.

$Verdoglobin_S$ und $Verdoglobin_{CN}$ konnten durch verschiedene Reaktionspartner gebildet werden. Dieses sowohl durch Blausäure und Wasserstoffperoxyd wie durch Schwefelwasserstoff und Wasserstoffperoxyd; jenes durch Schwefelwasserstoff und Sauerstoff, durch Arsenwasserstoff und Sauerstoff wie auch durch Hydroxylamin und Sauerstoff.

Hydroxylamin beschleunigte die Bildung von $Verdoglobin_S$ durch Schwefelwasserstoff und Sauerstoff.

Hydroxylamin oxydierte in geringer Konzentration Hämoglobin zu Hämiglobin. In großem Überschuß bildete es mit Hämiglobin eine Verbindung mit charakteristischem Spektrum.

Die Extinktionskonstanten der drei Verdoglobine und Verdiglobine wurden für den Bereich von 700—300 mμ bestimmt. Wie das Hämoglobin hatten auch die Verdoglobine ihre stärkste Extinktion im blauen Gebiet, in der Nähe von 400 mμ. Die Lage der Extinktionsmaxima wich von der des Hämiglobins und Hämoglobins ab, und die Extinktionskonstanten waren zum Teil erheblich geringer. Im sichtbaren Gebiet lag die stärkste Extinktion der Verdoglobine im roten Gebiet. Außer dem dort zwischen 600 und 630 mμ gelegenen Maximum war beim $Verdoglobin_{CN}$ und $Verdoglobin_{NO_2}$ noch ein zweites schwächeres zwischen 560 und 580 mμ nachzuweisen. $Verdiglobin_{CN}$ und $Verdiglobin_{NO_2}$ änderten im Gegensatz zum Hämiglobin ihre Extinktion nicht bei Änderung der Wasserstoffionenkonzentration von p_H 5—10. Sie bildeten keine Verbindungen mit Cyanid, Azid und Fluorid.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Friedrich-Schiller-Universität Jena
(Leiter: Prof. Dr. med. et phil. Richard Labes).

Beiträge zum Problem des Wirkungswandels.

II. Mitteilung.

Untersuchung über die Abhängigkeit der Adrena inwirkung von Bewegungsform und Tonuslage der Uterusmuskulatur.

Von

Leopold Ther und Siegfried Mehmke.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 9. Juli 1944.)

I. Einleitung.

Die ersten von H. Streuli [1] angestellten Beobachtungen über einen Wirkungswandel des Adrenalins haben durch die Untersuchungen von C. Amsler [2], Kolm und Pick [3], M. Turolt [4], F. Hazama [5], Handovsky [6] und in letzter Zeit durch die Arbeiten von L. Asher [7] weitere Ergänzungen erfahren.

Für den *Wirkungsmechanismus inverser Adrenalinwirkungen* sind zahlreiche Faktoren verantwortlich gemacht worden, auf die hier nicht näher eingegangen werden kann. Es scheint jedoch der Fall zu sein, daß neben physiko-chemischen Vorgängen an Oberflächen und Grenzflächen der Zelle (L. Asher [7]) vor allem die durch Fermente gesteuerte Oxydation des Adrenalins für den Wirkungsmechanismus der Umkehrreaktion verantwortlich ist. Die Untersuchungen über das Schicksal des Adrenalins im Organismus haben ergeben, daß Adrenalin, welches im Blut durch Askorbinsäure und Glutathion vor Oxydation geschützt wird, im Gewebe durch Fermente abgebaut wird, die entweder durch Abspaltung der Aminogruppe das Adrenalin in das unwirksame Dioxyphenylglykolaldehyd verwandeln oder durch Oxydation am Kern das Adrenalin zu gefärbten Produkten oxydieren. Welche Rolle der Sauerstoff für das Zustandekommen der Adrenalinwirkung überhaupt spielt, hat R. Labes [8] an der Kälbercarotis nachgewiesen, indem er zeigte, daß ein vollständig von Sauerstoff befreites Gefäßpräparat auf Adrenalin nicht mit einer Kontraktion reagiert. (Vgl. hierzu auch die Abhängigkeit der Erregungseffekte anderer Chinonbildner, z. B. des Hydrochinons, von Oxydationsprozessen, wie sie von R. Labes und H. Bergstermann am Blutegel, von L. Ther und E. Lüdde am Kaninchendarm beobachtet wurden.) Eine der ersten Oxydationsstufen des Adrenalins scheint jedenfalls für das Zustandekommen der typischen Adrenalinwirkung notwendig zu sein. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß andere Oxydationsstufen wirkungslos sind oder einen gegenteiligen Wirkungseffekt hervorrufen. Der Oxydationsverlauf des Adrenalins ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen *. Die chemisch-pharmakologische Analyse

* Eine Zusammenstellung der Literatur findet sich bei E. Werle: Chemie **56**, 305 (1943).

hat ergeben, daß das Adrenalin zunächst in Adrenalin-Chinon, und dieses durch Ringschluß unter Beteiligung des Aminostickstoffes in das Adrenochrom übergeht. Das Adrenochrom bildet mit seinem Dihydroprodukt ein Redoxsystem, das chemisch durch seine Potentiallage völlig vom System Adrenalin-Adrenalinchinon verschieden ist. Zwischen Adrenochrom und der letzten Oxydationsstufe des Adrenalins, dem sog. Pigment, sollen nach C. M. Bacq [11] noch weitere faßbare Zwischenstufen des Adrenalins liegen, von denen eine, das sog. Adrenoxin, eine dem Adrenalin entgegengesetzte Wirkung ausübt. C. M. Bacq und P. Heirmann [11] konnten zeigen, daß Extrakte aus Katzenuterus, welche man auf das Adrenalin einwirken läßt, bewirken, daß dieses sehr bald unter Rotfärbung seine Wirkung verliert. Die Wirkungslosigkeit dieser Oxydationsphase schlägt im weiteren Versuchsverlauf in eine dem Adrenalin entgegengesetzte Wirkung um. Zur Erklärung dieser Vorgänge nehmen die beiden Forscher das Vorhandensein eines Fermentes an, welches die Oxydation des Adrenalins zu Adrenoxin bewirkt, und welches für die lähmende Wirkung des Adrenalins in manchen Organen (Uterus) verantwortlich zu machen ist. Dieses Ferment soll nicht mit der Polyphenoloxydase identisch sein, denn es ist wärmeempfindlicher als dieses und wird durch Resorcin und Progesteron vollkommen gehemmt.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß bei verschiedenen Bewegungsformen und verschiedenen Spannungszuständen eines glattmuskeligen Organes auch der Stoffumsatz und die Stoffwechsellage qualitativ und quantitativ verschieden sind. Wenn man nun annimmt, daß der Funktionszustand eines glattmuskeligen Organes mit den Stoffwechselvorgängen in der Zelle in innigem Zusammenhang steht, so muß man daran denken, daß auch die Oxydation des Adrenalins je nach der gerade vorliegenden Stoffwechsellage des Organs qualitativ und quantitativ in verschiedener Richtung erfolgen kann. Dadurch können zeitliche Phasen, in denen verschieden wirkende Oxydationsprodukte vorherrschen, von Fall zu Fall verlängert oder verkürzt erscheinen. Von diesem Standpunkt aus wäre es verständlich, daß bei einer mehrphasisch verlaufenden Adrenalinreaktion die verschiedenen Wirkungsphasen neben anderen Faktoren auch auf ein zeitlich variierbares Vorherrschen verschiedener Oxydationsprodukte des Adrenalins zurückzuführen sind. Da uns hier vor allem der Wirkungswandel des Adrenalins interessierte, haben wir die Frage verfolgt, welche Veränderungen der Stoffwechsellage, die sich unter Umständen in einem veränderten Bewegungszustand glattmuskeliger Organe äußern können, auch zu einer veränderten Adrenalinwirkung führen. Einige Beobachtungen über derartige Verschiedenheiten der Adrenalinreaktion bei verschiedenen Bewegungs- und Spannungsformen überlebender Uterusprăparate sollen in der vorliegenden Arbeit mitgeteilt werden. Dabei wird sich zeigen, daß diese Beziehungen zwischen Bewegungsform und Adrenalinreaktion von Tier zu Tier und je nach der Stoffwechsellage und hormonalen Steuerung recht verschieden sind, wie ja auch die Bewegungsformen der Präparate von Tier zu Tier stärkeren Modifikationen unterworfen sind. Die Untersuchungsmethode war die gleiche, wie sie in der I. Mitteilung beschrieben wurde.

II. Mitteilung der Versuchsergebnisse.

1. Beobachtung einer Beziehung zwischen Adrenalinwirkung und Funktionszustand am Schafuterus.

Der Schafuterus liefert als überlebendes Muskelstreifenpräparat je nach seinem Funktionszustand verschiedenartig aussehende Kurvenbilder (Abb. 1, 2, 3). Auf den Kurven sind ganz allgemein zwei Arten von Bewegungen erkennbar, nämlich Tonusschwankungen und Pendelbewegungen. Da die Methodik einen Einfluß auf die Kurvenform ausübt, galt eine Reihe von Versuchen zunächst der Feststellung, ob es

Abb. 1. Schafuterus in 75 ccm Tyrode. Pfeil: 1 ccm Adrenalin 1 : 10000.

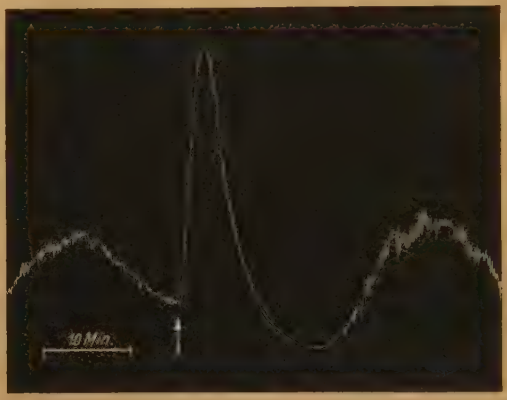


Abb. 2. Schafuterus in 75 ccm Tyrode. Pfeil: 1 ccm Adrenalin 1 : 10000.

möglich wäre, die Bewegungsformen der Muskelstreifen durch Wechsel der Bedingungen ineinander überzuführen. Es stellte sich dabei heraus, daß weder eine Änderung der Belastung des Schreibhebels noch geringe Temperaturunterschiede den Charakter der Kurve veränderten. Auch die Wahl verschiedener Teile des Uterus (Korpus, Horn) hatte ebenso wenig wie das Abpräparieren der Schleimhaut einen wesentlichen Einfluß auf den Bewegungstypus der Uterusmuskulatur. Die verschiedenen Bewegungsformen sind also anscheinend so eng mit den durch hormonale oder andere Vorgänge gesteuerten chemischen oder physiko-chemischen Zuständen des betreffenden Organs verknüpft, daß sie sich durch einfache thermische oder mechanische Einflüsse nicht allzu leicht verändern lassen.

Wir haben nun an 41 Schaf-Uterispräparaten mit den verschiedensten Bewegungsformen das Verhalten gegenüber Adrenalin geprüft und konnten folgende Beziehungen beobachten: Bei 6 Präparaten, bei welchen die *Pendelbewegungen im Vordergrund der Bewegungsleistungen* standen, trat die Adrenalinwirkung deutlich als Hemmung in Erscheinung. Die Pendelbewegungen, die in ihrer Gleichmäßigkeit sehr an die Tätigkeit eines überlebenden Dünndarmes erinnerten, hörten für einige Minuten

auf, der Muskel erschlaffte, erholte sich aber innerhalb einiger Minuten von selbst (Abb. 1).

Mit einer Änderung des Charakters der Uteruskurve war auch die Adrenalinwirkung vollkommen verändert. Standen nämlich, wie es bei 5 Präparaten der Fall war, die *Tonusschwankungen* im Vordergrund des Kurvenbildes, so reagierte der Muskelstreifen auf die gleiche Adrenalinkonzentration mit einer heftigen *Kontraktion*, der aber stets nach einigen Minuten eine kürzer oder länger andauernde Erschlaffung nachfolgte (Abb. 2).

Außer diesen beiden charakteristischen Bewegungstypen wiesen die übrigen überlebenden Schaf-Uterusprăparate zahlreiche andere Bewegungsformen auf, die meist zwischen den beiden geschilderten Extremen lagen. Bei diesen Kurvenbildern standen weder die Tonusschwankungen noch die Pendelbewegungen im Vordergrund der Bewegungsleistungen. Die Wirkung des Adrenalins war auch dementsprechend eine zweiphasische, d. h. auf eine kurz andauernde Kontraktion folgte eine ausgiebige Erschlaffung, aus welcher sich der Muskel nach einigen Minuten von selbst erholte (Abb. 3).

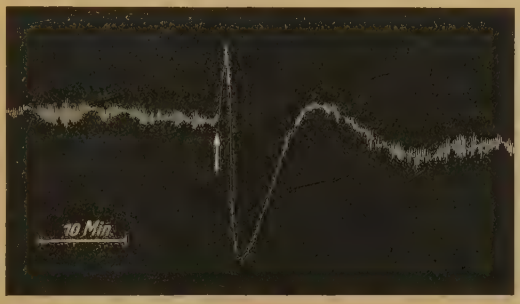


Abb. 3. Schafuterus in 75 ccm Tyrode. Pfeil 1 ccm Adrenalin 1 : 10000.

Sehr interessant waren auch einige Beobachtungen, die darauf hinwiesen, daß die erregende Adrenalinreaktion am überlebenden Schafuterus durch *Vorbehandlung mit Bariumchlorid* eine Änderung erfahren kann. Der Zusatz von 1 ccm einer 1%igen Bariumchloridlösung führte am überlebenden Schafuterus stets zu einer mehr oder minder heftigen Tonussteigerung, die in manchen Fällen stundenlang erhalten blieb. Des öfteren wurde aber auch beobachtet, daß eine durch Barium hervorgerufene Tonussteigerung sich schon nach einigen Minuten in mehr oder weniger regelmäßige Pendelbewegungen auflöste. Es konnte also durch Bariumeinwirkung der Charakter einer Uterusbewegungsform grundlegend geändert werden. Mitunter ging mit dieser Änderung der Uterusbewegungen eine Änderung der Adrenalinreaktion einher. So hatten wir beispielsweise bei drei Präparaten, ähnlich wie in Abb. 4, einen Schaf-Uterusmuskel vor uns, der zunächst neben kleinen Pendelbewegungen überwiegend Tonusschwankungen aufwies. Adrenalin löste dementsprechend eine starke Tonussteigerung aus, die sehr bald abklang und von den vorher beobachteten Tonusschwankungen abgelöst wurde. Ein nachfolgender Bariumzusatz bewirkte nach Abklingen der heftigen Tonussteigerung, daß jetzt Pendelbewegungen stärker in den Vordergrund

traten. In diesem pendelnden Zustand des Präparates wirkte ein Adrenalinzusatz im wesentlichen hemmend, während er vor der Bariumvergiftung im Stadium der Tonusschwankungen eine erhebliche Tonussteigerung hervorgerufen hatte.

Da wir diese Änderung der Adrenalinwirkung durch Bariumeinfluß nur dann beobachtet haben, wenn durch den Bariumzusatz auch eine

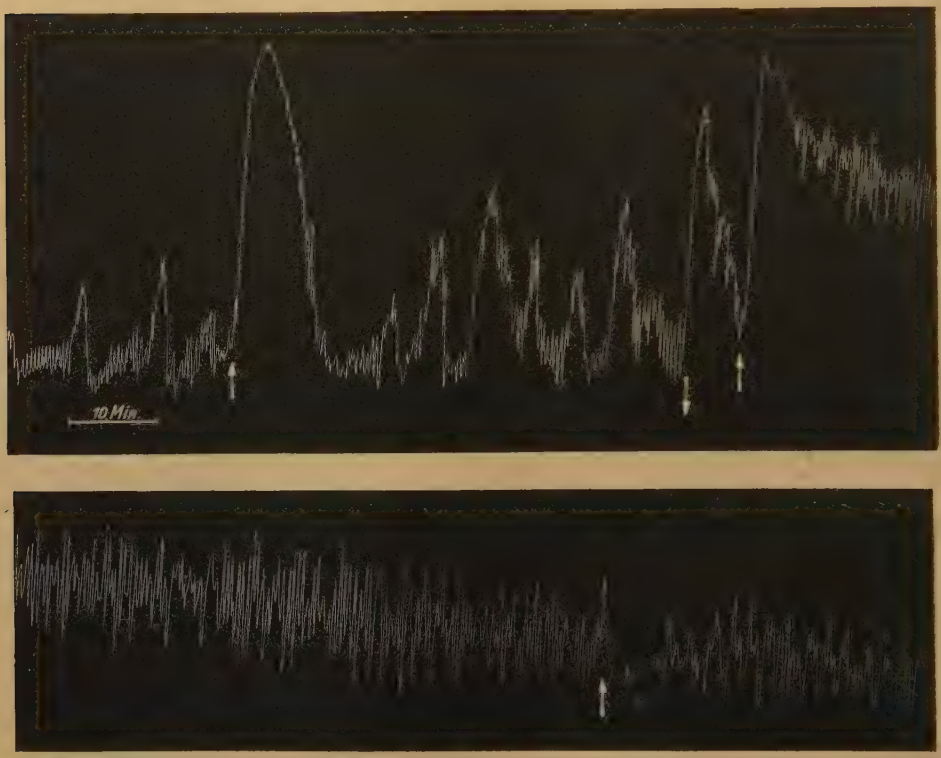


Abb. 4. Schafuterus in 75 ccm Tyrode. 1. und 4. Pfeil: 1 ccm Adrenalin 1 : 10000. 3. Pfeil: 1 ccm Bariumchlorid 1 : 100. 2. Pfeil: Auswaschen.

Änderung der Bewegungsformen im Sinne eines Überganges von Tonusschwankungen zu Pendelbewegungen hervorgerufen wurde, so steht diese sicher mit der Adrenalinreaktion in irgendeinem ursächlichen Zusammenhang. Es muß aber hier noch einmal ausdrücklich betont werden, daß die von uns beobachteten Beziehungen zwischen Uterusbewegungsformen und Adrenalinwirkung nur für den Schafuterus gelten.

Aus den geschilderten Versuchen geht demnach hervor, daß die Adrenalinwirkung vom jeweiligen Funktionszustand der Schafuterusmuskulatur abhängig ist. Eine derartige Abhängigkeit der Adrenalinwirkung vom jeweiligen Funktionszustand ist bereits auch an anderen Organen beobachtet worden und macht das Adrenalin als Kreislaufregler besonders geeignet. Nach H. Rein [12] kann nämlich je nach der lokalen Stoff-

wechsellage in den Geweben bald Drosselung, bald Erweiterung der Gefäße durch Adrenalin eintreten. Für den quergestreiften Muskel z. B. gilt, daß seine Gefäße im Zustand der aktiven Arbeit durch physiologische Dosen, d. h. durch Mengen, wie sie normalerweise von den Nebennieren abgegeben werden, nicht verengt werden, während ruhende Gefäße stark kontrahiert werden. Somit wird verständlich, daß auch die Herzkranzgefäße niemals durch Adrenalin verengt werden können. Auch die in toto isolierte Gallenblase des Meerschweinchens zeigt nach E. Adam[13] unter der Einwirkung von Adrenalin unabhängig von der Dosierung bei einem Druck von 2—4 cm Wassersäule eine vorübergehende Tonusabnahme und Aufhebung der rhythmischen Kontraktionen, bei Verminderung des Druckes eine Tonussteigerung.

Es ergab sich nun für uns als nächstes die Frage, ob auch bei Uruspräparaten anderer Tierspezies derartige Beziehungen zwischen Bewegungsform und Adrenalinwirkung in Erscheinung treten. Als nächstes Objekt wählten wir *Kaninchenuteri* geschlechtsreifer, nicht schwangerer Tiere, welche in den von uns mit 10 verschiedenen Präparaten angestellten Versuchen am Anfang der Versuche meist nur spärliche Spontanbewegungen aufwiesen, im weiteren Verlauf des Versuches jedoch meist deutliche Pendelbewegungen zeigten. Tonusschwankungen, wie wir sie beim Schafuterus beobachteten und beim Meerschweinchenuterus in späteren Versuchen studierten, haben wir beim Kaninchenuterus in unseren Versuchen niemals beobachten können.

Obwohl beim Kaninchenuterus *Pendelbewegungen im Vordergrund der Bewegungsleistungen standen,* führte das Adrenalin im Gegensatz zur pendelnden Schafuterusmuskulatur stets zu der bekannten, meist zweigipfeligen Kontraktion, nach deren Abklingen der Muskel den pendelnden Rhythmus wieder aufnahm. Da der Zusatz von Barium den Charakter der Kurve nur insofern änderte, als es zu einer von Fall zu Fall verschieden starken Tonuserhöhung kam, die meist von einer erheblichen Zunahme der Pendelbewegungen begleitet wurde, so fanden wir im Kaninchenuterus kein Objekt, um ähnlich wie beim Schafuterus das Adrenalin auch an der anderen Bewegungsform zahlreicher glattmuskeliger Organe, den Tonusschwankungen, studieren zu können. Es sei nur hier erwähnt, daß wir auch am Kaninchenuterus mit Adrenalin nach Bariumeinwirkung in einem Fall eine vorübergehende Tonusabnahme erzielen konnten.

Die weiteren Untersuchungen wurden daher am Meerschweinchenuterus angestellt, da dieser ebenso wie der Schafuterus je nach seinem Funktionszustand auf Adrenalin mit einer Erregung oder einer Erschlaffung reagieren kann.

2. Versuche am Meerschweinchenuterus über Funktionszustand und Adrenalinwirkung.

Die Kurven, welche die Uterusbewegungen geschlechtsreifer, aber nicht schwangerer Meerschweinchen wiedergaben, wiesen in den von uns untersuchten 30 Fällen stets Tonusschwankungen auf, die sich zumeist von den typischen, an eine Sinuskurve erinnernden Tonusschwankungen

des Schafuterus durch steileren, fast senkrechten Anstieg, nachfolgende Plateaubildung und durch den fast senkrechten Abfall unterschieden. Während jedoch bei unseren Untersuchungen am Schafuterus das Adrenalin bei Überwiegen der Tonusschwankungen stets eine heftige Kontraktion herbeiführte, findet man beim Meerschweinchenuterus im allgemeinen, daß der Uterus des virginellen und des schwangeren Tieres von Adrenalin gelähmt wird. In unseren Versuchen kam die hemmende Wirkung des Adrenalins dadurch zum Ausdruck, daß der Zusatz des Adrenalins zu einem sich in erhöhter Tonuslage befindlichen Präparat einen sofortigen Abfall der Kurve bewirkte, der mitunter tief unter die normale Fußpunktlinie reichte.

Die Tonusschwankungen des Meerschweinchenuterus unterschieden sich demnach von den Tonusschwankungen des Schafuterus nicht nur in einer mehr oder weniger veränderten, äußeren Kurvenform, sondern auch in der Reaktionsbereitschaft gegenüber Adrenalin. Aber auch bei Bewegungsphasen, die mehr an Pendelbewegungen erinnerten, wirkte das Adrenalin im allgemeinen hemmend. Eine Hemmung beobachteten wir auch, als wir die Präparate mit Bariumchlorid behandelten, wobei der Bariumtonus durch Adrenalin gesenkt wurde. Bei nicht schwangeren und nicht brünstigen Tieren konnten wir also bei unseren Versuchen niemals eine Umkehr vom Hemmungseffekt in den Erregungseffekt durch Bariumvorbehandlung beobachten, gleichgültig, wie sich der Bewegungszustand äußerte. (Dies scheint an dieser Stelle bemerkenswert zu sein, weil beim Papaverin, allerdings am Kaninchenduodenum, nach Bariumvorbehandlung eine zweiphasische Papaverinwirkung beobachtet wurde; siehe I. Mitteilung.) Am Meerschweinchenuterus scheint demnach in keinem Bewegungszustand die Stoffwechsellage bzw. die hormonale Steuerung des Organes für die Erregungsphase der Adrenalinwirkung günstig zu sein. Wir suchten daher unter brünstigen und mit Prolan vorbehandelten Tieren solche Uterispräparate aus, die auf Adrenalin mit einer Erregungsphase reagierten. Bei diesen Präparaten konnten wir dann im Zustand der durch Bariumchlorid hervorgerufenen Tonussteigerung die Adrenalinerregung in eine Adrenalinhemmung umkehren.

Kochmann und Seel[14] haben als erste gezeigt, daß Adrenalin auch am Meerschweinchenuterus zur Zeit der Brunst erregend wirkt. Sie fanden, daß diese Umkehr der Adrenalinreaktion schon einen Tag vor dem Oestrus auftritt und bis zu 4 Tagen nach dem Oestrus bestehen bleibt. Eine weitere Ausnahme von der angeblich stets lähmenden Wirkung des Adrenalins hat P. Holtz[15] gefunden, der zeigen konnte, daß der Meerschweinchenuterus ganz am Ende der Schwangerschaft durch Adrenalin erregt wird. Durch das Studium der Reaktion des Meerschweinchenuterus auf Adrenalin während verschiedener Stadien des Sexualzyklus und ihrer hormonalen Beeinflussung konnte P. Holtz[15] zeigen, daß bei Behandlung infantiler Tiere mit Follikelhormon und ebenso nach Prolanbehandlung sich eine Umkehr der Adrenalinreaktion erzielen läßt. Es besteht auf Grund dieser von P. Holtz[15] gefundenen Versuchsergebnisse demnach die Möglichkeit, experimentell den Meerschweinchenuterus in einen solchen

Funktionszustand überzuführen, in welchem Adrenalin eine Erregung der glatten Muskulatur herbeiführt.

Wir haben, um ein Uterispräparat zu erhalten, welches durch Adrenalin erregend beeinflußt wird, 4 nichtträchtige Meerschweinchen (durchschnittliches Gewicht 350 g) während 10 Tagen mit Prolan behandelt (25 R.E. pro die und Tier, subkutan). Nach 10 Tagen wurden die Tiere getötet und Uterusstreifenpräparate auf ihre Adrenalinreaktion geprüft. Bei 3 Präparaten haben wir eine hemmende Adrenalinwirkung beobachtet. Bei einem der 4 Präparate rief jedoch eine Adrenalindosis (1 ccm 1:10000), die zu dem in 75 ccm Tyrodelösung befindlichen Präparat zugesetzt

Abb. 5. Meerschweinchenuterus (mit Prolan vorbehandelt) in 75 ccm Tyrode. 1. 3. 4. und 6. Pfeil: 1 ccm Adrenalin 1:10000. 2. Pfeil: 1 ccm Bariumchlorid 1:100. 5. Pfeil: Auswaschen.

wurde, eine deutliche Erregung hervor (Abb. 5). Erhöhten wir nun durch Zusatz von 1 ccm 1%iger Bariumchloridlösung den Tonus des Präparates, so wirkte im Zustand dieser Tonuserhöhung das Adrenalin tonussenkend. Nach Auswaschen des Bariums und Rückkehr des normalen Tonuszustandes wirkte das Adrenalin wieder deutlich tonussteigernd.

An einem zweiten Uterispräparat, welches von einem brünstigen Meerschweinchen stammte, haben wir ebenfalls an ein und demselben Präparat die Adrenalinwirkung geprüft und gefunden, daß das Adrenalin vor dem Bariumzusatz und nach dem Auswaschen des Bariums und Abklingen der Bariumkontraktion tonussteigernd wirkt, während es bei Bariumgegenwart eine deutliche Tonussenkung herbeiführte.

Dieser von einem brünstigen Tier stammende und der mit Prolan vorbehandelte Meerschweinchenuterus, dessen Muskulatur auf Adrenalin mit einer Kontraktion reagierte, bot demnach ein schönes Beispiel dafür, daß ein Organ auf ein und denselben Reiz im erschlafften Zustand mit einer Erregung und im kontrahierten Zustand mit einer Lähmung antwortet. Da nach den Untersuchungen von P. Holtz[15] die erregende Wirkung des Adrenalins auf die Meerschweinchenuterusmuskulatur durch

das Follikel- oder Corpus-luteum-Hormon bewirkt wird, so interessierte uns, da diesen beiden Sterinderivaten möglicherweise eine oberflächenaktive Wirkung zukommt, im Hinblick auf die Untersuchungen von L. Asher [7] die Frage, ob sich am Meerschweinchenuterus auch in vitro ein Wirkungswandel des Adrenalins durch oberflächenaktive Stoffe erzielen läßt. Als kapillaraktive Stoffe haben wir eine Lösung von Natriumcholat (Merck) und Caprylalkohol (ketonfrei, Schuchardt) gewählt, beides Stoffe, welche auch bereits von L. Asher [7] zu ähnlichen Versuchen herangezogen wurden.

3. Versuche über die Beeinflussung der Adrenalinwirkung auf überlebende glattmuskelige Organe durch oberflächenaktive Stoffe.

L. Asher [7] und W. Stürchler [16] haben in einer Reihe von Versuchen am überlebenden Kaninchendarm zeigen können, daß eine Adrenalindosis, welche die Bewegungen des überlebenden Kaninchendarmes hemmte, nach Vorbehandlung mit Natriumcholat zunächst auch nicht erregend wirkt, sondern in der ersten Phase eine Hemmung hervorruft, und erst in der zweiten Phase eine fördernde Wirkung auslöst. Die Umkehrwirkung des Adrenalins besteht demnach nur darin, daß das Adrenalin jetzt eine zweiphasische Wirkung aufweist, indem einer anfänglich hemmenden Phase eine gesteigerte automatische Tätigkeit folgt. Leider geht aus der Beschreibung der Versuche von W. Stürchler [16] nicht hervor, wie lange dieser Erregungszustand bestehen bleibt.

Auch die Froschmagenmuskulatur, die eine Zeitlang unter dem Einfluß von Natriumcholat gestanden hat, antwortet auf Adrenalin nicht mehr mit einer Hemmung, sondern mit einer ganz leichten tonischen Kontraktion. Wir haben die Versuche von L. Asher [7] wiederholt und sind zu folgendem Ergebnis gelangt: Wurde ein Froschmagenring in der Versuchsanordnung nach Bernstein in Frosch-Ringer-Lösung (75 ccm) suspendiert und ließen wir Natriumcholat in einer Gesamtkonzentration von 1:1500 75 Min. einwirken, so erhielten wir nach dem Zusatz von Adrenalin (1 ccm einer Lösung von 1:10000) ebenfalls wie L. Asher [7] eine leichte Tonuserhöhung der Froschmagenmuskulatur. Diese Gesamtkonzentration des Natriumcholats 1:1500 und ebenso die Einwirkungszeit von 75 Min. ist von uns nach zahlreichen Versuchen zur Erzielung der Reproduzierbarkeit als am geeignetsten ermittelt worden.

Mit Caprylalkohol, einem anderen capillaraktiven Stoff, den wir ebenfalls in verschiedenen Konzentrationen (1:10000, 1:15000, stärkere Dosen wirken giftig) und verschieden langer Einwirkungszeit (40—170 Min.) auf das Froschmagenpräparat geprüft haben, ist es uns aber nicht gelungen, eine ähnliche Tonussteigerung durch Adrenalin herbeizuführen. Die stalagmometrische Messung der Oberflächenspannung einer Caprylalkohollösung (1:15000) ergab eine Tropfenzahl von 57 gegenüber Aqua dest. mit 53 Tropfen. Die Natriumcholatkonzentration, mit welcher wir noch

einen Umkehreffekt der Adrenalinwirkung erzielt haben, erhöhte dagegen die Tropfenzahl des destillierten Wassers von 53 auf 68 Tropfen. Da wir vom Caprylalkohol wegen seiner starken Giftigkeit keine dem Natriumcholat (1:15000) entsprechende isokapillare Lösung anwenden konnten, mußte die Frage, warum nach Vorbehandlung mit Caprylalkohol die Adrenalinwirkung sich nicht beeinflussen ließ, offen bleiben.

Folgende häufig gemachte Beobachtung scheint uns mitteilungswert zu sein. L. Asher [7] hat empfohlen, den Magenring mit Hilfe einer Bariumchloridlösung in den Zustand einer tonischen Kontraktion zu versetzen, damit die lähmende Adrenalinwirkung deutlich in Erscheinung tritt. Dabei konnten wir häufig einen bereits von

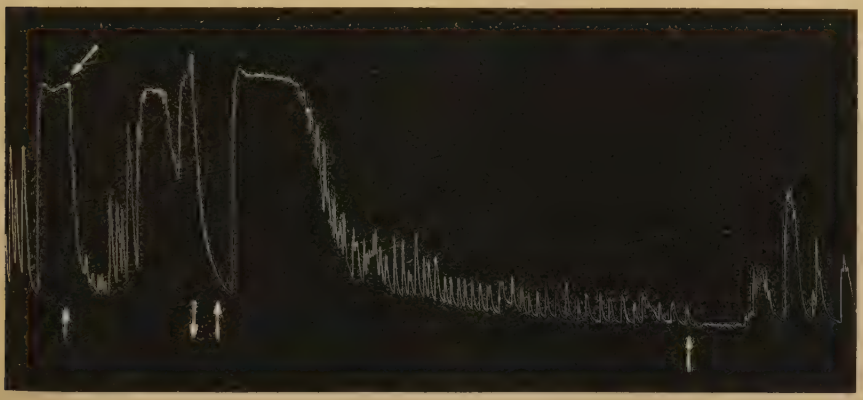


Abb. 6. Meerschweinchenuterus in 75 ccm Tyrode. 1. und 4. Pfeil: 1 ccm Adrenalin 1:10000, 2. Pfeil: Wechsel der Tyrodelösung, 3. Pfeil: Natriumcholat (Gesamtkonzentration 1:15000). Einwirkungszeit bis zur Adrenalinzugabe 1 Stunde.

R. Labes [8] beschriebenen Effekt des Adrenalins beobachten, der darin bestand, daß eine Adrenalindosis, die dem im Bariumtonus befindlichen Froschmägenpräparat zugesetzt wurde, eine heftige und länger andauernde Pendelbewegung hervorrief.

Wir haben nun in einer weiteren Versuchsreihe am Meerschweinchenuterus die Beeinflussung der Adrenalinreaktion durch Vorbehandlung mit Natriumcholat geprüft. Wir ließen verschiedene Natriumcholatkonzentrationen auf verschiedene in 75 ccm Tyrodelösung befindliche Meerschweinchenuterusprăparate einwirken und fanden, daß eine Gesamtkonzentration von 1:1500 in den fünf untersuchten Fällen stets eine Reaktion hervorrief, wie sie von W. Stürchler [16] am überlebenden Kaninchendarm beobachtet wurde.

Abb. 6 zeigt die Uterusbewegungen eines nichtbrünstigen Meerschweinchens, bei welchem Tonusschwankungen mit vorübergehenden Pendelbewegungen abwechseln. Um Mißverständnisse bei der Deutung der Abb. 6 zu vermeiden, die aus Raumersparnis ja nur einen kleinen Ausschnitt des Gesamtverlaufes des Versuches wiedergibt, sei bemerkt, daß die Tonusabnahme, die das Präparat durch Adrenalin (1. Pfeil in Abb. 6) erfährt, noch nicht als Beweis des Hemmungseffektes des Adrenalins

dienen könnte, weil in diesem Zustand einer derart erhöhten Spannung bekanntlich häufig spontane Tonusabfälle auftreten, wenn auch nicht so plötzlich wie in Abb. 6. Einige Zeit nach der Zugabe von Natriumcholat wies das Präparat bei gleichbleibender Höhe der Fußpunktlinie kleinere rhythmische Kontraktionen auf, die in Zeitabständen von einigen Minuten aufeinander folgten. Der Adrenalinzusatz wirkt in einer Gesamtkonzentration von 1:750000 beim nichtbrünstigen Meerschweinchen wie üblich auch nach Natriumcholat in der ersten Phase hemmend. In der zweiten Phase jedoch zeigte sich aber hier ein Erregungseffekt im Sinne einer Auslösung stärkerer Tonusschwankungen. Diese Erscheinung einer zweiphasischen Adrenalinwirkung nach Vorbehandlung mit Natriumcholat haben wir mehrfach festgestellt. In vielen Fällen, in denen wir den Adrenalineffekt vor und nach Natriumcholatzugabe untersuchten, haben wir das Adrenalin in einem Augenblick zugegeben, in dem sich die Kurve in Höhe der Fußpunktlinie befand. Wir haben dann stets am unvorbehandelten Präparat eine vorübergehende Unterbrechung der Bewegungsleistungen und oft auch eine deutliche Tonussenkung unter die Höhe der Fußpunktlinie beobachten können. Auch in diesen Fällen trat nach Natriumcholatbehandlung eine zweiphasische Adrenalinwirkung ein, wobei die zweite Phase sich in einer deutlichen Tonussteigerung oder in der Auslösung von stärkeren Tonusschwankungen äußerte, die bei fast allen Versuchen über längere Zeit bestehen blieb.

Vergleichen wir diesen durch Natriumcholat erzeugten Umkehreffekt mit dem durch Prolanvorbehandlung von uns am Meerschweinchenuterus erzielten, so fällt auf, daß nach Natriumcholatbehandlung ein zweiphasischer Adrenalineffekt zur Beobachtung gelangt, während durch das Prolan der Uterus so umgestimmt wurde, daß das Adrenalin einen echten Wirkungswandel im Sinne L. Ashers[7] erfährt, d. h. der Zusatz einer Adrenalinlösung wird in jedem Falle von einer sofort einsetzenden Kontraktion beantwortet.

Eine Durchsicht der Literatur ergab, daß bereits von W. T. Agar[17] eine ähnliche zweiphasische Wirkung des Adrenalins am immaturen Meerschweinchenuterus beobachtet wurde, die auftritt, wenn man das Präparat mit Eserin beeinflußt oder den Kaligehalt der Locke-Lösung auf das 2—3fache erhöht. Durch Atropin, Ergotoxin konnte ebensowenig wie durch Kokain dieser zweiphasische Effekt erzielt werden. Wir haben deshalb in weiteren Versuchsreihen auch noch andere Stoffe, darunter den oberflächenaktiven Caprylalkohol in einer Konzentration 1:15000 auf eine Beeinflussung der Adrenalinreaktion geprüft, ohne aber zu ähnlichen Resultaten wie bei Natriumcholat zu gelangen. Auch mit Resorcin, welches wir wegen seiner Polyphenoloxydase hemmenden Wirkung (s. S. 415) in Konzentrationen (1:750, 1:2000 und 1:7500) angewandt haben, ließ sich unter den von uns angestellten Bedingungen keine Änderung der Adrenalinwirkung am Meerschweinchenuterus erzielen.

Zusammenfassung.

1. Es wurde gezeigt, daß beim *Schafuterus* die Adrenalinreaktion mit dem Bewegungstypus des Präparates in Beziehung zu bringen ist. Standen die Pendelbewegungen im Vordergrund der Bewegungsleistungen, so fanden wir unter unseren Versuchsbedingungen eine Hemmung; überwogen die Tonusschwankungen, so beobachteten wir eine Tonussteigerung. Einige Präparate, welche ursprünglich vorwiegend Tonusschwankungen zeigten und dementsprechend mit einer starken Tonussteigerung reagierten, gingen durch Bariumeinwirkung in den Zustand der Pendelbewegung über, in welchem sie nunmehr auf Adrenalin eine überwiegende Hemmungsphase zeigten.

2. Der *Meerschweinchenuterus*, welcher in virginellem Zustand von Adrenalin gehemmt wird, reagiert im brünstigen Zustand auf Adrenalin mit einer Erregung. Er läßt sich nach P. Holtz auch durch Prolan so umstimmen, daß Adrenalin eine Erregung erzeugt. Setzten wir nach Auswaschen und Abklingen der Adrenalinerregung zu einem umgestimmten Präparat, welches durch Adrenalin zur Kontraktion gebracht wurde, Barium hinzu, so wurde der durch den Bariumzusatz tonisierte Uterusstreifen durch einen Adrenalinzusatz nunmehr zur Erschlaffung gebracht.

3. Im Anschluß an *Umkehrversuche* von L. Asher am Froschmagenring *mittels oberflächenaktiver Stoffe* wurden von uns Versuche am Meerschweinchenuterus angestellt. Wir konnten zeigen, daß Natriumcholat 1:1500 auch den Meerschweinchenuterus so verändert, daß eine vorher tonussenkende Adrenalindosis nach einstündiger Einwirkungszeit von Natriumcholat deutlich zweiphasisch wirkt, indem einer kurz andauernden Hemmung eine Zunahme der Bewegungsleistungen folgt.

Literatur.

[1] Streuli, H.: Z. Biol. **66**, 167 (1916). — [2] Amsler, C.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **127**, 148 (1927). — [3] Kolm u. Pick: Pflügers Arch. **184**, 79 (1920). — [4] Turolt, M.: Arch. Gynäk. **115**, 600 (1922). — [5] Hazama, F.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **106**, 223 (1925). — [6] Handovsky, Stämmler u. v. Trossel: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **105**, 15 (1925). — [7] Asher, L.: Der Wirkungswandel neurovegetativer Arzneimittel. Bern: Hans Huber 1941. — [8] Labes, R.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **127**, 148 (1927); **141**, 148 (1929); **152**, 111 (1930). — [9] Bergstermann, H.: Habil.arbeit Jena 1940. — [10] Ther, L. u. E. Lüdde: Erscheint in Naunyn-Schmiedebergs Arch. — [11] Bacq, C. M. u. P. Heirmann: C. r. Soc. Biol. Paris **126**, 1264, 1268 (1937). — Bull. Acad. Belg. Méd., Brüx. **1938**, 29. — Arch. internat. Physiol. **46**, 417 (1938). — [12] Rein, H.: Einführung in die Physiologie des Menschen. Berlin: Springer 1940. [13] Adami, E.: Boll. Soc.ital. Biol. sper. **16**, 273 (1941). — [14] Kochmann, M. u. H. Seel: Z. exper. Med. **68**, 238 (1929). — [15] Holtz, P. u. K. Wöllpert: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **185**, 20 (1937). — [16] Stürchler, W.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **183**, 411 (1936). — [17] Agar, W. T.: J. Physiol. (Brit.) **98**, 492 (1940).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen.

Studien über Methämoglobinbildung.

XXX. Mitteilung.

Versuche mit Polyphenolen.

Von

Fritz Jung und Peter Witt.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 27. August 1946.)

Während die aromatischen Stickstoffverbindungen als Blutgifte nach allen Richtungen gut untersucht und ihre Umsetzungen weitgehend aufgeklärt sind, ist das für die ebenfalls *Hämiglobin* (Methämoglobin, Hb [3]) bildenden Polyphenole vorliegende Material relativ dürftig. Ihre gelegentliche Anwendung in der Therapie, einige neuere Vergiftungsfälle [1] und die Suche nach neuen Gesichtspunkten zur Beurteilung der katalytischen Bildung von Hb (3) waren Veranlassung zu folgender Studie.

Heubner hatte die spontane Oxydation von Hämoglobin (Hb [2]) durch Luftsauerstoff in Gegenwart von Hydrochinon erheblich beschleunigt gefunden und für diesen Effekt das Redoxsystem Chinon-Hydrochinon verantwortlich gemacht [2]. Diese Deutung setzt für die Hb (3)-Bildung durch Phenole Chinonisierung voraus, ein Vorgang, der beim Resorcin nicht möglich ist. Tatsächlich ist Resorcin in vitro auch wirkungslos. Wir versuchten dasselbe auch in vivo an Katzen nachzuweisen und haben darüber hinaus einige Versuche mit Pyrogallol, Phloroglucin und schließlich auch Benzochinon vorgenommen, da keine vergleichenden Versuche mit den verschiedenen Phenolen in der Literatur vorliegen.

I. Methodik.

Alle Untersuchungen wurden an Katzen vorgenommen. Zur Erzielung gleichmäßiger und guter Resorption wurde die einzelne Substanz intraperitoneal, in Rapsöl gelöst, verabreicht. Das Blut wurde den Tieren aus dem Ohr entnommen. Die Bestimmungsmethoden für Hb (2) und Hb (3) waren dieselben wie in den vorhergehenden Studien. Die Verdoglobinbestimmung konnte infolge Harnstoffmangels nicht nach Kiese [3] durchgeführt werden. Um über die laufenden Veränderungen im Blut eine Aussage machen zu können, wurde von zwei Blutproben die eine mit Ferricyankalium und Cyanid, die andere mit Hydrosulfit und CO behandelt und dann die Lichtabsorption beider Lösungen im Roten verglichen. — Veränderungen der Erythrozyten wurden nach Vitalfärbung mit Brillantkresylblau beurteilt.

II. Versuche mit Diphenolen.

a) Hydrochinon.

Die Wirkungen des Hydrochinons auf die Katze sind ausführlich von Heinz Oettel [4] studiert worden. Nach peroraler Verabreichung beobachtete er zunächst Ptyalismus, Lidspasmus und motorische Unruhe. Später ging die anfängliche Erregung der Tiere in Tonusverlust und schließlich Atemlähmung über. Hb (3) trat am lebenden Tier selten und nur in

Tabelle 1.

	Versuchsnummer und Bezeichnung des Versuchstiers	Dosis mg/kg	Dosis 10^{-5} Mol kg Tier	Hämoglobin (Mittelwert) 10^{-2} Val l Blut	Hämoglobin (Mittelwert) 10^{-4} Val kg Tier	Hb (3) (nach Abzug des Ausgangswerts) % des Hämoglobins	Hb (3) Val 10^{-4} kg Tier	Zeitpunkt der maximalen Hb (3)-Konzentration Std. nach Dosis	Heinz-Körperchen in % der Erythrozyten	Hämoglobinabnahme % Verlust	
a) Hydrochinon	1. V	15	13,6	0,55	4,1	—	—	—	11	—	
	2. VI	15	13,6	0,50	3,75	—	—	—	0	—	
	3. V	40	36,4	0,49	3,7	—	—	—	(6)	—	
	4. VI	40	36,4	0,49	3,7	—	—	—	(2)	—	
	5. V	78	70,9	0,49	3,7	6,6	0,24	2,5	(6)	—	Exitus nach 24 Stunden
	6. IV	80,2	72,9	0,51	3,8	3,9	0,15	5,5	8	—	
b) Brenzcatechin	7. X	10	9,1	0,50	3,8	—	—	—	0	20	
	8. XI	20	18,2	0,60	4,5	5,2	0,23	0,8	(3)	0	
	9. X	30	27,3	0,46	3,5	7,3	0,25	1,5	(9)	15	
	10. XI	40	36,4	0,61	4,6	14,9	0,68	1,2	18	8	
	11. XIII	40	36,4	0,50	3,8	6,6	0,25	1,2	(2)	5	
c) Resorcin	12. XI	40	36,4	0,53	4,0	15,4	0,61	4	0	0	
	13. X	60	54,5	0,37	2,8	39	0,96	11	?	66	Exitus nach 13 Stunden
	14. XII	60	54,4	0,39	2,9	—	—		(2)	0	Exitus nach 24 Stunden
	15. XIII	60	54,5	0,6	4,5	3,5	0,16	2	(2)	19	
	16. XIV	60	54,5	0,5	3,8	4	0,15	0,5	—	0	
	17. XIII	80	72,7	0,55	4,1	7,5	0,31	2,3	14	0	Exitus nach 3 Stunden
	18. XV	100	90,9	0,51	3,8	6,5	0,25	4	6	0	
d) p-Chinon	19. I	8,2	7,6	0,6	4,7	—	—	—	9	—	
	20. III	10,8	10,0	0,5	3,9	—	—	—	(5)	—	
	21. I	13,7	12,7	0,5	3,9	2,5	0,08	1	(5)	23	
	22. I	14,4	13,3	0,5	3,8	3,4	0,13	2	(4)	15	
	23. IV	15,2	14,1	0,6	4,3	5,4	0,23	4,5	10	50	
	24. I	38,5	35,6	0,5	3,8	5,0	0,19	4,8	10	30	
	25. II	41,8	38,7	0,6	4,8	6,2	0,3	0,8	0	—	Exitus nach 5,5 Stunden
e) Pyrogallol	26. X	10	7,9	0,53	3,9	11	0,43	1,3	12	22	
	27. XI	20	15,8	0,58	4,3	22	0,95	1	22	18	
	28. XI	40	31,6	0,56	4,2	45	1,92	1	(28)	70	gran. Ery.
	29. X	40	31,6	0,44	3,3	52	1,69	1	(24)	58	„ „
	30. XII	40	31,6	0,5	3,5	41	1,43	1	(32)	66	„ „

geringer Konzentration auf. Postmortal konnte es dagegen größere Werte erreichen. Die schlechte periphere Durchblutung machte die Blutentnahme oft schwierig.

Das Ergebnis unserer Versuche ist in Tabelle 1a dargestellt. Auch bei den kleineren Dosen, welche keine meßbare Hb(3)-Bildung herbeiführten, war das Blut auffallend dunkel. Da die dunkle Farbe nach dem Hämolysieren und Verdünnen bestehen blieb, wurde das Auftreten von Verdoverbindungen vermutet und bei großen Dosen auch mit dem Spektroskop festgestellt. In Ermangelung eines Spektrographen war jedoch der Charakter des Verdoglobins nicht näher bestimmbar. Deutlich vermehrte Konzentrationen von Hb(3) traten erst nach Dosen von etwa 80 mg/kg auf, das Bildungsverhältnis $\frac{\text{Val Hb (3)}}{\text{Mol Gift}}$ betrug in diesen beiden Versuchen 0,03 und 0,02. Es war also sehr klein. An den roten Blutkörperchen wurden keine toxischen Veränderungen beobachtet, und es trat im Anschluß an die Vergiftung auch keine Anämie auf.

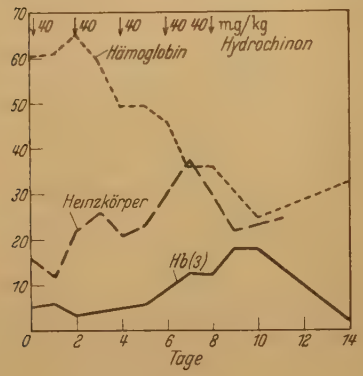


Abb. 1. Wiederholte Gabe von Hydrochinon. ——— Hb (3) in % des Gesamthämoglobins. — — — Heinzkörperchen in % der Erythrozyten. ···· Hämoglobin in Val. 10^{-4}/l Blut.

Die intraperitoneale Injektion der Substanz wurde von einer sehr geringfügigen Schmerzreaktion begleitet, aber wenige Minuten später wurden die Tiere unruhig, begannen zu zittern, ihre Hinterbeine erschienen auffallend steif, die Augen waren zugekniffen und tränten heftig. Besonders auffallend war der profuse Speichelerguß. Es dauerte tagelang, bis das Tier wieder einen normalen Anblick bot. — Entsprechend den Angaben von Heubner [5] und den Befunden von Oettel treten die Blutgiftwirkungen des Hydrochinons den anderen Erscheinungen gegenüber völlig in den Hintergrund.

Da Oettel angibt, daß bei fortgesetzten Hydrochinoninjektionen ein Teil der Tiere empfindlicher wird, wobei es unter Ikterus, Hämolyse und schwerer Anämie schließlich zum Tode kommt, während ein anderer Teil der Tiere allmählich resistent wird, haben wir in 3 Versuchen über längere Zeit Hydrochinon wiederholt appliziert.

1. Katze VIII erhielt jeden 2. Tag 40 mg/kg, und zwar 5mal. Am 10. Tag war das Hämoglobin auf 42% des Anfangswertes gefallen, das Hb(3) erreichte am selben Tag seinen Höhepunkt mit 28%, auch die Heinz-Körperchen waren vermehrt. Am 14. Tag war das Hb(3) wieder abgefallen und das Hb stieg wieder langsam an. Nach jeder Einzelinjektion war eine kräftige Allgemeinreaktion aufgetreten (vgl. Abb. 1).

2. Katze VI wurde genau so behandelt. Bei ihr sank das Hämoglobin nur auf 64% des Ausgangswertes und das Hb(3) stieg nach der letzten Injektion nur auf 15%. Die Katze starb einen Tag nach der 5. Injektion.

3. Katze IV erhielt eine erstmalige Injektion von 80 mg/kg (vgl. Tabelle 1, Versuch 6) und vom 3. bis 19. Versuchstag jeden 2. Tag 40 mg/kg. Am 21. Tag wurden 80 mg/kg und am 22. Tag 160 mg/kg verabreicht. Das Hämoglobin sank bis zum 12. Tag erheblich ab, stieg aber dann,

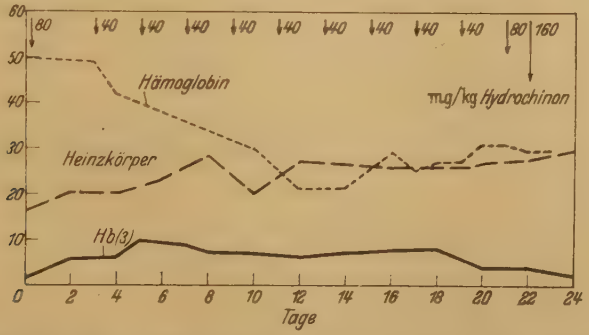


Abb. 2. Wiederholte Gabe von Hydrochinon. ——— Hb (3) in % des Gesamthämoglobins. — — — Heinzkörperchen in % der Erythrozyten. ---- Hämoglobin in Val. 10^{-4}/l Blut.

trotz der Weiterbehandlung, wieder an, um sich schließlich auf einem etwas erniedrigten Niveau zu halten. Das Hb(3) stieg bis zum 5. Tag geringfügig an, hielt sich bis zum 19. Tag etwa auf gleicher Höhe und sank dann, trotz der in diesem Zeitpunkt verabreichten großen Dosen, auf den Ausgangswert ab. HEINZ-Körperchen waren schon zu Versuchsbeginn vorhanden, sie vermehrten sich im Laufe der Zeit etwas. Die Katze starb 15 Tage nach der letzten Injektion, 37 Tage nach Versuchsbeginn. Die Sektion ergab neben einer abnormen Magerkeit (trotz guter Pflege und Ernährung) keinen besonderen Befund (vgl. Abb. 2).

Wir können also die Angaben von OETTEL bestätigen; die Gewöhnung wie die Empfindlichkeitssteigerung drückt sich auch an der (relativ geringen) Hb(3)-Bildung aus.

b) Brenzcatechin.

Nach DIETERING [6] und ELLINGER [7] ist das Brenzcatechin ein Krampfgift mit vorwiegend zentralem Angriffspunkt. Bei fortgeschrittener Vergiftung kommt es zu Lähmungserscheinungen, speziell der Atmung und dadurch schließlich zum Tod. Nach DIETERING und VOLLMER [8] führen wiederholte Vergiftungen zu Überempfindlichkeit. Hb(3)-Bildung wird von keinem der Autoren vermerkt.

Unsere Ergebnisse sind aus Tabelle 1b zu entnehmen. Dosen von 20—40 mg/kg bilden Hb(3), wobei das Dosis-Wirkungsverhältnis etwa 0,1

beträgt. Das Brenzcatechin ist somit erheblich wirksamer als das Hydrochinon. In einem Versuch kam es auch zu einer Vermehrung der Heinz-Körperchen. Die nachfolgende Anämie war unbedeutend. Verdoglobin konnte wie beim Hydrochinon nachgewiesen werden.

Wenige Minuten nach der Injektion traten Krämpfe auf, die Katzen zitterten heftig, die Augen waren zugekniffen, aus den Mundwinkeln floß Speichel, und das Fell wurde feucht von Schweiß. Nach 2—3 Stunden trat Erholung ein, die Tiere lagen dann apathisch in der Ecke. 24 Stunden später waren sie wieder munter und gefräßig.

c) Resorcin.

Die Resorcinvergiftung entspricht nach Ellinger der Brenzcatechinvergiftung, nur soll das Brenzcatechin erheblich wirksamer sein. Der Tod der Tiere soll unter Pulsverlangsamung und Blutdrucksenkung als Folge einer Vasomotorenlähmung eintreten. Bildung von Hb(3) und Heinzkörperchen wurde von Liebenam[1], Hämolyse von Haenelt[9] und folgende Anämie von Becher[1] beobachtet.

Unsere Versuche sind in Tabelle 1c zusammengestellt. Zwei der Tiere, nämlich X und XI, hatten bereits mehrere Vergiftungen mit anderen Substanzen durchgemacht. Ihr Verhalten wich von dem der übrigen Tiere ab. Bei den unvorbehandelten Tieren war die Hb(3)-Bildung unerheblich, selbst bei 80 und 100 mg/kg wurde 7,5% Hb(3) nicht überschritten. Das Bildungsverhältnis war daher wie beim Hydrochinon sehr klein und lag um 0,03. Auch Heinz-Körperchen wurden nicht wesentlich gebildet.

Wenige Minuten nach der Injektion kam es zu Muskelzuckungen, Lidspasmus und Zittern, in einem Fall war ein heftiger Schweißausbruch vorhanden. Die Bewegungen der Tiere waren etwas ataktisch.

Obwohl bei Katze X und XI ein erheblicher Zeitraum seit den anderen Vergiftungen (mit Brenzcatechin, Pyrogallol und Phloroglucin) verstrichen war, zeigten sie ein wesentlich anderes Bild. Bereits 2 Stunden nach der Injektion war Hb(3) in erheblichen Mengen vorhanden, am Maximum ergab sich ein Umsetzungsverhältnis von etwa 0,2, also mehr als im Durchschnitt der Brenzcatechinversuche. Bei Katze X traten außer den Heinz-Körperchen noch andere degenerative Veränderungen an den roten Blutkörperchen auf. Sie ließen vor ihrem Tod einen dunkelroten — hämoglobinhaltigen — Urin. Ihr schwierig zu gewinnendes Blut war dünn und bräunlich. Beide Tiere machten einen schwerkranken Eindruck. Das eine Tier starb zu Versuchsende, das andere 28 Tage später.

d) Benzochinon.

Die auffallend geringfügige Hb(3)-Bildung durch die Diphenole führte uns zur Durchführung einiger Versuche mit Benzochinon. Wöhler und Friedrich[10] wie Otto Schulz[11] berichten nichts über Hb(3)-Bildung,

während es nach S. Cohn [12] eindeutig nachweisbar ist. Heubner [5] nennt Chinon einen direkten Hb(3)-Bildner, macht aber keine Angaben über Bildung in vivo.

Unsere Versuchsergebnisse gibt Tabelle 1d. Der Ablauf eines Versuches ist in Abb. 3 gegeben. Der Höhepunkt der Hb(3)-Bildung wurde nach 1—5 Stunden erreicht; er ist der Größe der Dosis ungefähr proportional. Das Bildungsverhältnis betrug im Durchschnitt 0,09. Die Heinz-Körperchenvermehrung war geringfügig, doch trat im Anschluß an jeden Versuch eine Anämie auf. Im Blutausstrich waren neben den Heinz-Körperchen mitunter granulierte Erythrozyten zu sehen (vgl. unten).

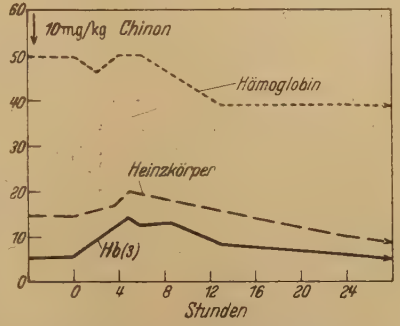


Abb. 3. Bildung von Hb(3) durch Chinon. ——— Hb(3) in % des Gesamthämoglobins. — — — Heinzkörperchen in % der Erythrozyten. ···· Hämoglobin in Val. 10^{-4}/l Blut.

Unmittelbar nach der Injektion kam es zu einer erheblichen Schmerzreaktion, wohl infolge der starken peritonealen Reizwirkung des Chinons. Die Katzen waren unruhig, lagen am Boden und leckten sich. Auffallend war wieder ein starker Speichelfluß. Später kam es zu Schwäche und starkem Durst. Die Ohren wurden kalt und das Blut sah dunkel und dickflüssig aus (Verdoglobin). In drei Fällen kam eine mühsame, rasselnde Atmung hinzu, die ebenso wie die (meist vorhandene) Bluteindickung ein Lungenödem zur Ursache haben konnte. Appetitlosigkeit, Schwäche und starker Durst bestanden im Anschluß an die Vergiftung noch tagelang. — Wie bei den Diphenolen spielte die Hb(3)-Bildung neben den sonstigen Erscheinungen auch bei der Chinonvergiftung keine Rolle. In einem Fall ging ein Tier zugrunde, ohne daß Hb(3) in bedenklichen Mengen auftrat.

III. Versuche mit Triphenolen.

a) Pyrogallol.

Auch die Giftigkeit des Pyrogallols für den Blutfarbstoff ist geringfügig im Verhältnis zu der der Nitroverbindungen (Heubner [5]). Doch bezeichnen Konrady [1] wie Pewny [1] die Cyanose als das auffälligste Vergiftungssymptom. Außerdem tritt im Anschluß an eine einmalige akute Vergiftung ein rapider Erythrozytenabfall auf: bei einem Vergiftungsfall sank trotz wiederholter Transfusionen das Hämoglobin auf etwa 30%. Domarus [13] und Weichsel [14] verwandten es daher zur Erzeugung experimenteller Anämien an Hunden und Katzen. Der Urin wird bei derartigen Vergiftungen auffallend braun und enthält massenhaft Erythrozyten und

Leukozyten. Große Mengen von Retikulozyten sollen im peripheren Blut vergifteter Kaninchen nachweisbar sein (Wassiljew[15]). Bei humanen Vergiftungen wurde Schwäche, Übelkeit, Schwindel und Atembeschleunigung beobachtet. Ein Säugling zeigte tonisch-klonische Zuckungen. — Bei der Sektion vergifteter Tiere fiel Domarus auf, daß das lymphoide Gewebe der Milz sehr reduziert war und die rote Pulpa sich fast ausschließlich aus kernlosen Erythrozyten zusammensetzte.

In Tabelle 1e sind unsere Versuche zusammengestellt. Abb. 4 gibt den Ablauf eines einzelnen Versuches ausführlicher wieder. Die Hämiglobinbildung war diesmal ausgesprochen, sie betrug bei Dosen um 40 mg/kg etwa 50% des Gesamthämoglobins und erreichte ihr Maximum in allen Versuchen etwa 1 Stunde nach Versuchsbeginn. Das Bildungsverhältnis betrug etwa 0,5. Bei den kleineren Dosen waren die Heinz-Körperchen einwandfrei vermehrt, bei den großen Dosen wurde die Beurteilung der Heinz-Körperchen jedoch durch das massenhafte Auftreten granulierter Zellen erschwert. Das optische Bild sah dem einer Phenylhydrazin- oder Phenylendiaminschädigung der Blutkörperchen außerordentlich ähnlich. Sehr auf fallend bei der Blutentnahme war auch die Neigung der Erythrozyten zur Verklumpung. Nach 6—8 Stunden trat bei den größeren Dosen regelmäßig eine schnelle Abnahme des Gesamthämoglobins im Blute auf, so daß zu Versuchsende meist eine sehr ausgesprochene Anämie vorlag. Die tiefsten Hämoglobinwerte wurden erst nach 3—5 Tagen erreicht, dann erholten sich die Tiere wieder langsam. Bildung von Verdoglobin konnte auch nachgewiesen werden.

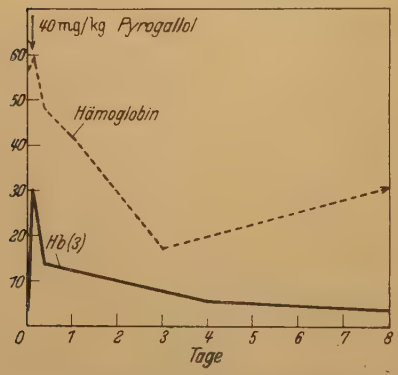


Abb. 4. Bildung von Hb(3) durch Pyrogallol. ——— Hb(3) in Val. 10^{-4}/l Blut · · · · Hämoglobin in Val. 10^{-4}/ Blut.

Die sonstigen Allgemeinerscheinungen traten nach Pyrogallol sehr zurück. Im Maximum der Hb(3)-Konzentration waren die Tiere müde und schwach. Lidspasmus usw. fiel weg. Man kann also nach unseren Versuchen das Pyrogallol zu den Hb(3)-bildenden und anämisierenden Stoffen rechnen. Der Zusammenhang zwischen den beobachteten Erythrozytenveränderungen, welche Wassiljew ohne Unterschied als Retikulozyten anspricht, die aber zweifellos Ausdruck einer Schädigung der Zellen sind, und der Anämie konnte auf Grund von elektronenoptischen Untersuchungen für eine Anzahl hämolytischer Gifte geklärt werden[16]. Obwohl wir hier keine elektronen-optischen Kontrollaufnahmen mehr vornehmen konnten, zweifeln wir auf Grund des lichtoptischen Bildes wie des weiteren Versuchsablaufes

nicht mehr daran, daß jene granulierten Zellen eben dieselben Zerstörungen an der Zellmembran aufweisen, die wir etwa bei der Phenylendiamin- oder bei der Phenylhydrazinvergiftung nachweisen konnten. Während das Hämoglobin der zerstörten Zellen zum größten Teil entweicht und so zum Bild der intravitalen Hämolyse führt, wird der Rest der Zellen auf Grund seiner veränderten Oberflächenbeschaffenheit (vgl. hierzu die Verklumpungsneigung) in der Milz abgefangen und führt dort zu dem von Domarus beschriebenen Bild. Die Schädigung der Zellen findet bereits in den ersten Stunden nach der Giftapplikation statt, die Ausscheidung der geschädigten Zellen aber zieht sich je nach dem Umfang der Zerstörung einige Zeit hin, d. h. die Anämie erreicht ihre höchsten Werte erst am 3.—5. Tag nach der Vergiftung.

b) Phlorogluzin.

Über Phlorogluzinvergiftungen finden sich in der Literatur nur wenig Angaben. Nach Ellinger ist es kaum giftig. Er stellte nach subcutaner Gabe an Ratten vereinzelt leichte Muskelzuckungen fest; beim Hund trat der Tod erst nach einer Dosis von 1 g je Kilogramm ein, ohne daß Hb(3) gefunden wurde. Das ist an sich nicht besonders verwunderlich, da Phlorogluzin nicht einmal Eiweiß fällt, ja sogar die Blutgerinnung hemmen soll.

In einer Anzahl von Versuchen sollte eine etwaige Hb (3)-Bildung nachgewiesen werden. Wir haben dazu Dosen von 10—160 mg/kg verabreicht. Das Ergebnis war sehr überraschend, denn statt einer wenn auch nur angedeuteten Vermehrung des Hb (3) hatten wir den Eindruck, daß die primär vorhandene „physiologische" Hb (3)-Konzentration sich verringerte. Etwa 1 Stunde nach der Applikation wurde der tiefste Wert erreicht, worauf wieder ein langsamer Anstieg auf die Norm einsetzte. Allgemeinerscheinungen wurden keine beobachtet.

Die Ungiftigkeit des Phlorogluzins wird durch diese Versuche bestätigt. Um den eigentümlichen Effekt des Verschwindens der normalen Hb(3)-Konzentration wieder zu verfolgen, haben wir noch einige Versuche angeschlossen, in denen die rückbildende Wirkung des Phlorogluzins eingehender untersucht wurde.

Den Katzen wurde Dinitrobenzol 6 mg/kg verabreicht und Phlorogluzin in Dosen von 100 mg/kg einmal oder mehrmals in den verschiedenen Phasen der Vergiftung zugegeben. Im Anstieg der Vergiftung verabreichtes Phlorogluzin war ohne Einfluß auf den Ablauf (4 Versuche). Eine schwache Förderung der Rückbildung wurde jedoch gesehen, wenn das Phlorogluzin später als 4 Stunden nach der Dinitrobenzolapplikation gegeben wurde. — Das Phlorogluzin scheint demnach einen geringfügigen Einfluß auf die Hb(3)-Rückbildung zu besitzen, zu einer therapeutischen Auswertung ist er sicherlich zu gering.

IV. Besprechung.

Die Wirkungen der untersuchten Stoffe sind in Tabelle 2 zusammengestellt und durch einige Zahlen für aromatische Stickstoffverbindungen ergänzt worden.

Die Phenole bilden in wesentlich geringerem Umfang Hb(3) als die entsprechenden Nitroverbindungen. Abgesehen vom Pyrogallol bleiben die Umsetzungsverhältnisse: neugebildete Äquivalente Hb (3) zu Mol Gift weit unter 1. Es besteht somit keine Veranlassung, eine katalytische Umsetzung anzunehmen, wie sie bei den Nitroverbindungen postuliert werden muß. Auch bei Einrechnung der Rückbildungsgeschwindigkeit des Hb (3) im Organismus nach einem an anderer Stelle angegebenen Verfahren [17] ergeben sich keine wesentlich höheren Werte. Diese Feststellung wird dadurch gestützt, daß das Resorzin, welches niemals in ein katalytisches System der von Heubner vorgeschlagenen Art übergehen kann (Unmöglichkeit der Chinonbildung), ebenso Hb(3) zu bilden vermag wie das Hydrochinon. Man muß und kann daher bei allen Phenolen ohne wesentliche Gegenargumente die Hb(3)-Bildung als Nebenreaktion einer Oxydation des Phenols durch den molekularen Sauerstoff des Blutes auffassen (gekoppelte Oxydation). Es bestehen hierzu eine Anzahl analoger Beispiele. Wie bei den meisten anderen gekoppelten Oxydationen beschränkt sich der aktive Sauerstoff nicht nur auf eine Oxydation des Hämoglobineisens, sondern er greift auch am Porphyrinring an (Bildung von Verdoverbindungen), und denaturiert das Stromaeiweiß (Bildung von Heinz-Körperchen bzw. granulierten Erythrozyten, Herbeiführung von Hämolyse und Anämie). Chinon bildet erheblich stärker Hb(3) als Hydrochinon, was wohl auf die erheblich bessere Ausnützung der Oxydationsäquivalente bei einer direkten Hb(3)-Bildung zurückzuführen ist. Man kann auch von diesem Befund her ausschließen, daß das Chinon-Hydrochinonsystem für die Hb(3)-Bildung in vivo entscheidend ist, denn es müßten dann beide Partner in annähernd gleichem Ausmaß wirksam sein. (Vgl. hierzu die Wirksamkeit von Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol, die lange nicht so verschieden ist.)

Das Auftreten von Verdoglobin bei der Chinonvergiftung ist nicht überraschend, nachdem für die Reaktion von Chinon mit Hämoglobin in vitro diese Umsetzung schon lange nachgewiesen ist.

Zwischen den nervösen Erscheinungen, d. h. dem Allgemeinbild und der Hb(3)-Bildung besteht durchaus keine Parallelität. Man wird, ebenso wie bei den aromatischen Nitroverbindungen (v. Bredow und Jung [18]), auch hier annehmen müssen, daß es sich um Wirkungen handelt, welche dem Ringsystem zukommen und nichts mit den reduzierenden Eigenschaften der Phenolgruppe zu tun haben. Ein Vergleich der Dosen kann das sinnfällig machen. Bei sämtlichen Substanzen, die im Dosisbereich von über $10—30 \cdot 10^{-5}$ Mol/kg untersucht worden sind, d.h. deren Hb(3)-Bildung so gering ist, daß ohne Gefahr für das Tier derartige Dosen verabreicht

werden können, sind neben der Hb(3)-Bildung mehr und mehr die anderen Vergiftungssymptome bestimmend. Die Substanzen, die in geringeren Dosen letal oder schwer toxisch wirken, besitzen diesen Effekt im wesentlichen auf Grund ihrer Hb(3)-Bildung. (Vgl. hierzu Tabelle 2.)

Tabelle 2.

Substanz	Dosisbereich der Versuche $\frac{\text{Mol } 10^{-5}}{\text{kg Tier}}$	Äquivalenz Hb (3) je Mol Substanz	Zeitpunkt der maximalen Hb(3)-Konzentration Stunden	HEINZ-Körperbildung	Nerv. Vergiftungserscheinungen
Hydrochinon . . .	15— 80	0,03	~ 4	—	++
Brenzcatechin . . .	10— 40	0,1	1	—	++
Resorcin	40— 90	0,03	~ 2	—	+
Pyrogallol	8— 30	0,5	1	Hämolyse +	—
Phlorogluzin	8—130	—	—	—	—
Chinon	8—40	0,09	~ 2	+	+ Lungenödem
Nitrobenzol	8— 30	0,9	6	++	(+)
Nitrotoluole	20—400	~ 0,05	—	++	++
Dinitrobenzol . . .	4— 5	7,8	10	+++	—
2,4-Dinitrotoluol .	6— 20	1,4	5	—	—
2,6-Dinitrotoluol .	10— 60	0,5	5	+	+
Trinitrobenzol . . .	2— 7	4,8	1	+++	—
Trinitrotoluol . . .	10— 40	1,7	3	+++	(+)
Anilin	—	2,5	?	++	—

Die Allgemeinwirkungen des Chinons sind wohl auf seine kräftigen Oxydationseffekte zurückzuführen. Sowohl unsere Beobachtungen wie die der zitierten Autoren deuten auf eine Lungenschädigung hin. Dieselbe Wirkung kommt bekanntlich auch dem Chloramin und dem Chlorpikrin bei intravenöser Gabe zu. Es wurde ferner schon oben ausgeführt, daß das von uns beschriebene Bild durch die starke peritoneale Reizung kompliziert wird.

Das Wirkungsverhältnis der einzelnen Phenole zueinander läßt sich nicht wie bei den Nitroverbindungen auf einen festen Nenner bringen. Man hätte erwartet, daß die m-Verbindung wesentlich weniger wirksam als die p-Verbindung ist, und es überrascht noch mehr die große Ungiftigkeit des Phlorogluzins. Ein Vergleich mit dem reaktiven Verhalten in vitro bringt keine Klärung, da hier Resorcin erwartungsgemäß unwirksam ist, ebenso auch Phlorogluzin, und die anderen Substanzen sich in der Reihe Hydrochinon < Brenzcatechin < Pyrogallol ordnen. Wie dieses Problem so bedarf auch fraglos die Empfindlichkeitssteigerung bzw. -minderung noch eines eingehenden Studiums. Sie beruht, wie die Versuche am Hydrochinon zeigten, keineswegs auf einer Änderung des Hb (3)-bildenden Prozesses, sondern auf einer Änderung des primären Hydrochinon- usw. stoffwechsels. Es wäre sonst nicht zu verstehen, daß die Anpassung innerhalb der anderen Symptome die Hb (3)-Bildung miterfaßt. — Diese Bemerkung ist nicht selbstverändlich, denn wir konnten inzwischen zeigen,

daß die Empfindlichkeitsänderungen, welche man bei wiederholter Dinitrobenzolvergiftung registrieren kann, zu einem Teil auf Veränderungen der Rückbildungsfähigkeit des Tieres für Hb(3) beruhen.

Zusammenfassung.

Hydrochinon, Brenzcatechin und Resorcin bildeten an der Katze nur sehr schwach Hb(3), das Vergiftungsbild wird durch andere Symptome beherrscht. Auch Erythrozytenschädigungen konnten kaum beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war die Pyrogallolvergiftung weitgehend durch die Hb(3)-Bildung und die parallel einsetzende Blutkörperchenzerstörung bestimmt. Phlorogluzin bildete im Tierkörper kein Hb(3), es scheint vielmehr seine Rückbildung etwas zu fördern.

Die Bildung von Verdoglobin konnte bei der Hydrochinon-, Brenzcatechin-, Pyrogallol- und Chinonvergiftung der Katze festgestellt werden.

Die Ergebnisse der Versuche an den verschiedenen Phenolen, wie auch am Benzochinon, machen eine katalytische Hb(3)-Bildung in vivo sehr unwahrscheinlich.

Literatur.

[1] Becher, J.: Slg Vergift.fälle A. **4**, 7 (1933). — Konrady, L.: Slg Vergift.fälle A. **7**, 179 (1936). — Liebenam, L.: Slg Vergift.fälle A. **6**, 175 (1935). — Pewny, R.: Slg Vergift.fälle A. **6**, 187 (1935). — [2] Heubner, W.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **72**, 241 (1913). — [3] Kiese, M.: Klin. Wschr. **25**, 265 (1941). — [4] Oettel, Heinz: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **183**, 319 (1936). — [5] Heubner, W.: Erg. Physiol. **43**, 15 (1940). — [6] Dietering, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **188**, 493 (1938). [7] Ellinger, A.: Handbuch der experimentellen Pharmakologie. Bd. 1, S. 1023ff. 1923. — [8] Vollmer, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **175**, 424 (1934). — [9] Haenelt: Münch. med. Wschr. **1925 I**, 386. — [10] Wöhler u. Friedrich: Ann. Chem. u. Pharm. **65**, 343 (1848). — [11] Schulz, Otto: Inaug.-Diss. Rostock 1892. — [12] Cohn, Sally: Inaug.-Diss. Königsberg 1893. — [13] Domarus, A. v.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **58**, 319 (1908). — [14] Weichsel, J.: Z. klin. Med. **97**, 26 (1923). — [15] Wassiljew, A.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **169**, 130 (1933). — [16] Jung, F.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. (im Druck). — [17] Jung, F.: Habil.schrift. Berlin 1944. — [18] Bredow, M. v. u. F. Jung: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **200**, 335 (1942).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen.

Die Wirkung der Phenole auf den Blutdruck.

Von

Fritz Jung und Peter Witt.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 27. August 1946.)

Allen Phenolen soll nach P. Marquardt[1] eine blutdrucksenkende Wirkung zukommen. Da diese Behauptung eine gewisse prinzipielle Bedeutung besitzt, jedoch die einheitlichen Befunde Marquardts nicht mit Angaben früherer Autoren übereinstimmen [2, 3], haben wir im Rahmen der vorhergehenden Untersuchung einige Blutdruckversuche durchgeführt.

Der Blutdruck wurde bei den Katzen mit einem Gummimembranmanometer unter Gegenstrominfusion nach Trendelenburg aus der Karotis registriert. Die Atmung wurde mittels einer Mareyschen Kapsel geschrieben. Die Versuchstiere waren teils unbehandelt, teils hatten sie mehrere Vergiftungen überstanden. Der Versuch wurde in Pernoctonnarkose durchgeführt. Die einzelnen Phenole verabreichten wir intravenös in die Vena jugularis oder femoralis. Doch spielte die Wahl des Gefäßes keine Rolle für den Effekt. Unsere Einzeldosen bewegten sich von den durch Marquardt angewandten Dosen um 1 mg je Tier aufwärts bis zu Dosen mit deutlicher toxischer Wirkung am Blut oder Nervensystem. Im Verlauf eines Versuchs wurde meist die tödliche Dosis — als Summe der Einzeldosen berechnet — weit überschritten. Das Tier ging dementsprechend gewöhnlich an Atemlähmung zugrunde.

Wir konnten bei der Katze keine auffallenden Blutdruckwirkungen der verschiedenen Phenole (Hydrochinon, Brenzcatechin, Pyrogallol) nachweisen, auch p-Chinon war fast wirkungslos. Weder Dosen um 1 mg je Tier, d. h. etwa 0,3—0,5 mg je Kilogramm noch Dosen von 10—20 mg je Kilogramm führten zu einer eindeutigen Blutdrucksenkung der von Marquardt beschriebenen Art. Im Anschluß an die Injektion stieg der Druck eher geringfügig für etwa eine Minute an. Obwohl die im Laufe der Zeit verabreichten Einzeldosen die toxische Grenze erreichten und überstiegen, hielt sich der Blutdruck stundenlang auf etwa gleicher Höhe. Die Atmung wurde durch die kleineren Dosen nicht beeinflußt, den größeren Dosen folgten Störungen des Rhythmus und der Atemtiefe, die nicht mehr reversibel waren. Entsprechend traten nach diesen größeren Dosen stärkere unregelmäßige Schwankungen des Blutdruckes auf, ohne daß sich das

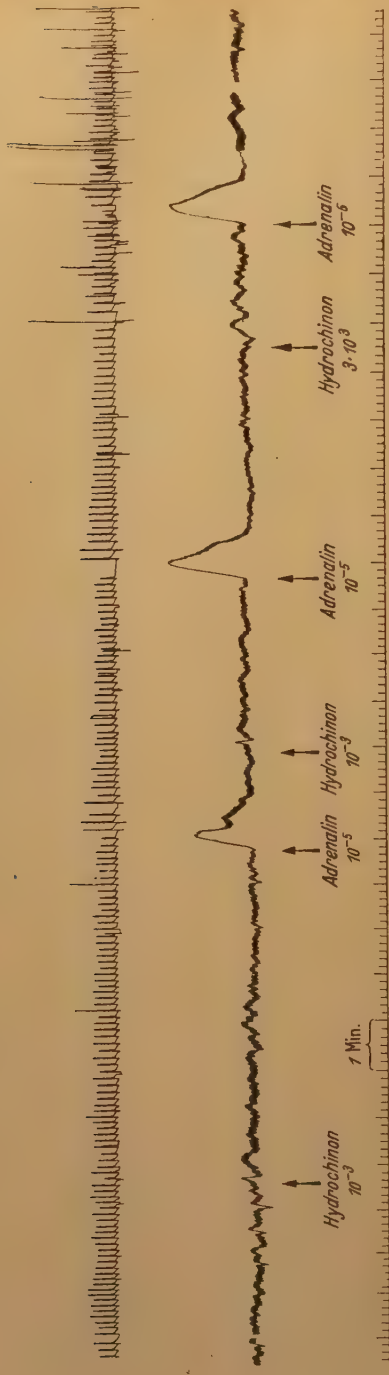


Abb. 1. Katze in Pernoctonnarkose. Testung von Hydrochinon. Untere Kurve: Blutdruck. Obere Kurve: Atmung.

Durchschnittsniveau erheblich verschoben hätte. — In einem einzelnen Versuch an einem Hund traten auf Brenzcatechin und Hydrochinon geringfügige, schnell vorübergehende Blutdrucksenkungen auf, die etwa den Angaben Marquardts für das Kaninchen entsprechen.

Es handelt sich somit bei dem von Marquardt beschriebenen Effekt um kein besonderes spezifisches Phänomen, das vielleicht sogar für die zweite Phase der Adrenalinwirkung verantwortlich wäre, sondern um eine unspezifische, bei jeder Tierart anders verlaufende Reaktion. Wir möchten die von uns beobachteten geringfügigen Tonussteigerungen, ebenso wie die Erregungszustände, Krämpfe usw. an der wachen Katze und die nach größeren Dosen auftretenden Atmungsstörungen auf zentrale Phenolwirkungen zurückführen. Wir schließen uns damit den von Barger und Dale[2] gegebenen Deutungen an. Geht die Wirkung der Phenole weiter und kommt es schließlich zu Lähmungen des Vasomotorenzentrums, so kann man in dieser Endphase des Versuchs neben der Atemlähmung eine erhebliche Blutdrucksenkung beobachten, die aber mit der von Marquardt angeschnittenen Frage nichts mehr zu tun hat.

Literatur.

[1] Marquardt, P.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **201**, 234 (1943). — [2] Barger u. Dale: Proc. roy. Bull. **41**, 19 (1910). — [3] Gibbs u. Hare: Arch. Physiol. **1890**, 352.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Kiel in Kappeln a. d. Schlei.

Darstellung und Eigenschaften von Verdoglobinen.

II. Mitteilung.

Zur Konstitution des Verdoglobin$_{NO_2}$.

Von

MANFRED KIESE.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 3. September 1946.)

Einige in der vorigen Mitteilung [1] beschriebene Eigenschaften des Verdoglobin$_{NO_2}$, wie seine Lichtextinktion und die Reduktion zu Hämoglobin ließen vermuten, daß dieses Verdoglobin in seiner Konstitution abweicht von der anderer Verdoglobine, bei denen eine Oxydation des Häms an einer Methingruppe erfolgt ist. Diese Verdoglobine bzw. Verdochromogene, das Verdoglobin$_A$, das durch gekoppelte Oxydation von Hämoglobin und Askorbinsäure durch Sauerstoff entsteht [2, 3, 4, 10] und das Verdochromogen$_H$, das durch Umsetzung von Pyridinhämochromogen mit Hydrazinhydrat und Sauerstoff gebildet wird [5], zerfallen in Eisessig in Gallenfarbstoff [6, 7, 8]. Das Verdoglobin$_{NO_2}$ gibt diese Reaktion nicht. Das vom Globin als Chromogen abgetrennte Verd$_{NO_2}$ ist in seiner Lichtabsorption vielmehr dem Phäohäm und Spirographishäm sehr ähnlich. Wie diese Häme [9] bildet das Verd$_{NO_2}$ mit Pyridin und Hydrazinhydrat Verdochromogene mit einer Bande bei 585 mμ und geht unter dem Einfluß des Reduktionsmittels in ein Chromogen über, das nach der Lage seiner Banden zwischen dem Protohämochromogen und dem Deuterohämochromogen steht. Der nach Entfernung des Eisens aus dem Verd$_{NO_2}$ und Veresterung mit Methylalkohol erhaltene Porphyrinester wird aus Äther, nach Extraktion des Protoporphyrinesters mit 4% Salzsäure, mit 8% Salzsäure extrahiert. Die beiden Banden des Esters in Salzsäure sind gegenüber denen des Protoporphyrinesters nach Rot versch-

[1] KIESE, M.: Arch. exper. Path. (D.) **204**, 385 (1947). — [2] ANDERSEN, A.B. and P.D'A HART: J. Path. a. Bacter. **39**, 465 (1934). — [3] EDELBACHER, S. u. A. v. SEGESSER: Naturw. **25**, 461, 557, 667 (1937). — [4] LEMBERG, R., J. W. LEGGE and W. H. LOCKWOOD: Biochem. J. (Brit.) **33**, 754 (1939). — [5] WARBURG, O. u. E. NEGELEIN: Ber. dtsch. chem. Ges. **63**, 1816 (1930). — [6] LEMBERG, R.: Biochem. J. (Brit.) **29**, 1322 (1935). — [7] ENGEL, M.: Z. physiol. Chem. **266**, 135 (1940). — [8] LEMBERG, R., W. H. LOCKWOOD and J. W. LEGGE: Biochem. J. (Brit.) **35**, 363 (1941). — [9] WARBURG, O. u. E. NEGELEIN: Biochem. Z. **244**, 9 (1932). — [10] LEMBERG, R., B. CORTIS JONES and M. NORRIE: Biochem. J. (Brit.) **32**, 149, 171 (1938).

ben. In Äther, Pyridin und Dioxan hat der Ester ein Absorptionsspektrum vom Rhodotyp mit Banden bei den gleichen Wellenlängen wie Spirographisporphyrinester, nämlich bei 640, 580, 555 und 512 mμ.

Auf Zusatz von Hydroxylaminhydrochlorid und wasserfreiem Natriumkarbonat zur Lösung des Esters in Pyridin tritt Blauverschiebung der Banden und Änderung des Spektraltyps vom Rhodotyp zum Ätiotyp ein, eine Reaktion, die auch beim Spirographisporphyrin und Phäoporphyrin beobachtet wird unter Bildung des Oxims. Behandlung des Oxims mit Essigsäureanhydrid stellt den Rhodotyp des Spektrums wieder her unter Rotverschiebung einer Bande, wohl durch Umwandlung des Oxims ins Nitril. Eine ähnliche Veränderung des Spektrums wie bei der Behandlung mit Hydroxylamin tritt, allerdings etwas langsamer, nach Zusatz von Hydrazinhydrat zum Porphyrinester in Pyridin ein.

Die Oximbildung zeigt die Anwesenheit einer Karbonylgruppe auf und der Rhodotyp des Spektrums weist darauf hin, daß sie sich nicht an einer Methinbrücke befindet, da solche Porphyrine keinen Rhodotyp des Spektrums zeigen [11].

Behandlung mit Benzoylchlorid in Pyridin ändert weder die Lage der Banden noch den Typ des Spektrums. Demnach sind reaktionsfähige Hydroxylgruppen nicht vorhanden. Einwirkung von Sauerstoff auf die Lösung des Verdochromogens in Pyridin bei 60° war ebenfalls ohne Einfluß. Hydroxylgruppen an den Methinbrücken, die durch Oxydation von Hämochromogen mit Wasserstoffperoxyd eingeführt werden können [12,13], werden durch Sauerstoff in Pyridin zu Ketonen oxydiert [14].

Reinigung des Porphyrinesters bis zur Krystallisation und Elementaranalyse konnten noch nicht durchgeführt werden. Der Mangel an Chemikalien ließ nur die Aufarbeitung kleiner Ansätze zu, die für spektrophotometrische Untersuchungen ausreichten. Die vorgebrachten Daten, die mit denen von WARBURG und FISCHER für das Spirographishäm angegebenen übereinstimmen, dürften jedoch den Schluß rechtfertigen, daß das $Verd_{NO_2}$ mit dem Spirographishäm identisch ist, zumal Verbindungen wie das Phäoporphyrin entsprechend der Herkunft des $Verd_{NO_2}$ aus Hämoglobin nicht zu erwarten sind.

FISCHER und DEILMANN [15] haben Protoporphyrindimethylester mit Osmiumtetroxyd und Wasserstoffperoxyd zu Spirographisporphyrindimethylester oxydieren können. Da wir den Ester noch nicht reinigen konnten, ist nicht zu übersehen, ob die Gewinnung aus dem $Verd_{NO_2}$ einfacher ist.

---

[11] STERN, A. u. H. WENDERLEIN: Z. physik. Chem. A **175**, 405 (1936). — [12] FISCHER, H. u. H. LIBOWITZKY: Z. physiol. Chem. **251**, 198 (1938). — [13] LIBOWITZKY, H.: Z. physiol. Chem. **265**, 191 (1940). — [14] STIER, E.: Z. physiol. Chem. **272**, 239 (1942); **273**, 47 (1942). — [15] FISCHER, H. u. K. O. DEILMANN: Z. physiol. Chem. **280**, (1944).

Während das abgetrennte $Verd_{NO_2}$ offenbar mit dem Spirographishämin identisch ist, weichen $Verdoglobin_{NO_2}$ und Spirographis-Hämoglobin, das WARBURG und NEGELEIN [9] aus Spirographishäm und Globin synthetisiert haben, in ihren Extinktionskurven etwas ab. Die Veränderungen des Hämoglobins durch die Einwirkung von Nitrit und Wasserstoffoxyd sind wahrscheinlich nicht auf die Oxydation einer Vinylgruppe des Protohäms beschränkt. Vielleicht betreffen sie auch die Bindung der prosthetischen Gruppe an das Protein. Auf solche Möglichkeiten scheint ein Unterschied in der Extinktion von Chromogenen hinzudeuten. Während das abgetrennte Verd mit Pyridin ein Verdochromogen mit einer Bande bei 585 mμ bildet, entsteht aus $Verdoglobin_{NO_2}$ in Pyridinwasser durch Reduktion mit Dithionit eine Verbindung mit einer Bande bei 610 mμ. Beide Verbindungen gehen in das Hämochromogen mit der Bande bei 552 mμ über.

Versuche.

1. Beständigkeit des $Verd_{NO_2}$ in Eisessig.

Wurde nach dem Vorgang LEMBERGS [8] eine Lösung von Hämoglobin, die $Verdoglobin_A$ enthielt, in die doppelte Menge Eisessig gegossen, so färbte sich die Lösung blaugrün durch das gebildete Biliverdin, das aus Äther mit 5%iger Salzsäure extrahiert werden konnte. Nach Eingießen einer Lösung von $Verdoglobin_{NO_2}$, das in der früher beschriebenen Weise[1] hergestellt war, in die doppelte Menge Eisessig trat nicht Blau-Grün-Färbung, sondern Rotfärbung ein. Wurde die Lösung nach einer Stunde in Äther gegossen und der Äther nach Waschen mit Natriumazetat und Wasser mit 5%iger Salzsäure extrahiert, so konnte im Gegensatz zu dem entsprechenden Ansatz mit $Verdoglobin_A$ kein Biliverdin entzogen werden, wohl aber unverändertes $Verd_{NO_2}$.

2. Abtrennung der prosthetischen Gruppe des $Verdoglobin_{NO_2}$.

Wurde $Verdoglobin_{NO_2}$ in chloridhaltigen heißen Eisessig gegossen und die Lösung abgekühlt, so erfolgte keine Krystallisation entsprechend der von Hämin bei Behandlung von Hämoglobin in der gleichen Weise. Es kam auch nicht zum nichtkrystallinen Ausfall von Verd, so daß auf diesem Wege eine Abtrennung der prosthetischen Gruppe nicht möglich war.

Die Abtrennung erfolgte vielmehr nach drei Verfahren, die nebeneinander angewandt werden mußten, da häufig die für das eine oder das andere erforderlichen Chemikalien nicht vorhanden waren. Bevorzugt wurde die *Abtrennung mit Pyridin-Eisessig-Chloroform.* 100 ccm der Lösung des $Verdoglobin_{NO_2}$ die nach der Dialyse der Ansätze von Hämoglobin mit Nitrit und Wasserstoffperoxyd erhalten wurde, wurden mit 50 ccm Pyridin und 50 ccm Eisessig versetzt. Nach 12—24 Stunden wurde mit

50—100 ccm Chloroform kräftig durchgeschüttelt und das Gemisch anschließend zentrifugiert. Die wenig gefärbte wäßrige Schichte und das denaturierte Protein wurden verworfen, die Chloroformlösung nochmal filtriert und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingetrocknet. Das so erhaltene, mit Häm verunreinigte Verd wurde nicht weiter fraktioniert. Für spektrophotometrische Untersuchungen wurde es in Pyridin-Wasser- oder Hydrazinhydrat-Wasser-Gemischen gelöst.

Entsprechend der Hämindarstellung nach MÖRNER[16] wurde *die Abtrennung des Verd$_{NO_2}$ mit Alkohol-Schwefelsäure* vom denaturierten Verdoglobin$_{NO_2}$ durchgeführt. 300 ccm dialysierte Verdoglobinlösung wurden mit 500 ccm Wasser verdünnt, mit 5 ccm 1%iger Schwefelsäure angesäuert und bis zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde filtriert, der Rückstand erst mit Wasser, dann mit Alkohol angerieben und filtriert. Der trockene Rückstand wurde dann mit 300 ccm Alkohol, dem 3 ccm konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt waren, behandelt und nach 2—3 Stunden abfiltriert. Die Lösung enthielt nur einen Bruchteil des gesamten Verd. Wurde das Filtrat nach Zusatz von 2 ccm 37%iger Salzsäure aufgekocht, so fiel nach dem Erkalten meist nur wenig Verd aus. Darum wurde die gesamte Lösung ohne Zusatz von Salzsäure und Aufkochen aufgearbeitet, indem entweder nach der Neutralisation der Schwefelsäure mit Ammoniak im Vakuum eingetrocknet oder die Lösung mit einem Überschuß von Kalziumkarbonat versetzt wurde. Das Verd wurde an das Kalziumkarbonat adsorbiert und nach Abfiltrieren des Alkohols mit Pyridin herausgelöst. Das Pyridin wurde im Vakuum abgedampft. Da Äthylalkohol-Schwefelsäure nur einen kleinen Teil des Verds aus dem denaturierten Verdoglobin extrahierte, wurde wiederholt der Rückstand noch im Soxhlet-Apparat mit Äthylalkohol oder Methylalkohol, die etwa 10% Chlorwasserstoff enthielten, extrahiert. Die stark gefärbten Extrakte enthielten kein Verd, sondern den daraus erhältlichen Porphyrinester. Jedoch war die Ausbeute ebenfalls gering.

Schließlich wurde die *Abtrennung des Verd$_{NO_2}$ in salzsaurem Azeton* durchgeführt. 100 ccm der dialysierten Verdoglobinlösung wurden mit 10 ccm normaler Salzsäure versetzt und in 2 Liter Azeton, die 20 ccm normale Salzsäure enthielten, gegossen. Vom ausgefallenen Protein wurde abfiltriert und die Azetonlösung nach Neutralisation mit Ammoniak im Vakuum zur Trockne gebracht.

3. *Pyridinverdochromogen$_{NO_2}$.*

In Pyridinwasser löste sich das Verd$_{NO_2}$ als Verdichromogen das keine charakteristische Extinktion aufwies. Durch Zusatz von sehr wenig Dithionit ($Na_2S_2O_4$) wurde es zu Pyridinverdochromogen reduziert, das

[16] MÖRNER: Z. physiol. Chem. **29**, 187 (1908).

eine Bande bei 585 mμ hat. Unmittelbar nach Zusatz des Dithionits beginnt die Umwandlung des $Verdochromogen_{NO_2}$ in ein Hämochromogen mit einer α-Bande bei 552 mμ (Abb. 1).

Wurde $Verd_{NO_2}$ in Pyridin bei 60° 1—2 Stunden mit Luft geschüttelt, so trat keine Änderung des Absorptionsspektrums des $Verdochromogen_{NO_2}$ ein. In Eisessig gebracht erwies sich die Verbindung so beständig wie vorher.

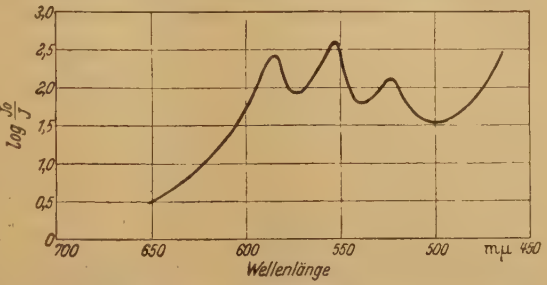


Abb. 1. Pyridin-$Verdochromogen_{NO_2}$ (Bande bei 584 mμ) in Umwandlung zu Pyridinhämochromogen (Bande bei 552 mμ) begriffen.

4. Porphyrinmethylester aus $Verd_{NO_2}$.

Zur Darstellung des Porphyrinesters wurde das aus 200 ccm Verdoglobinlösung erhaltene Verd in 30 ccm Methylalkohol gegeben, der mit Chlorwasserstoff gesättigt war. Das Gemisch wurde eine Stunde unter Rückfluß gekocht. Dabei wurde aus dem größten Teil des Verds das Eisen abgespalten und die Propionsäuren verestert. Nach dem Erkalten wurde das Gemisch in 50—100 ccm Äther gegossen und 5-normale Kalilauge bis zur alkalischen Reaktion zugegeben. Die wäßerige Lösung wurde abgetrennt und der Äther zweimal mit Wasser gewaschen. Dann wurden die Prophyrinester fraktioniert mit Salzsäure extrahiert. Zunächst wurde mit dreimal 10 ccm 4 %iger Salzsäure Protoporphyrinester entfernt. Mit dreimal 10 ccm 8%iger Salzsäure wurde dann der Porphyrinester des $Verd_{NO_2}$ entzogen, der im Gegensatz zum roten Protoporphyrinester in Salzsäure rotviolette Farbe hatte. Der Ester wurde sogleich wieder mit Kalilauge in Äther getrieben und nach nochmaliger Abtrennung von Protoporphyrinester mit 4% Salzsäure wieder mit 8%iger Salzsäure extrahiert und abermals in Äther getrieben. Der Mutteräther wurde anschließend noch mit 12%iger und 16%iger Salzsäure extrahiert.

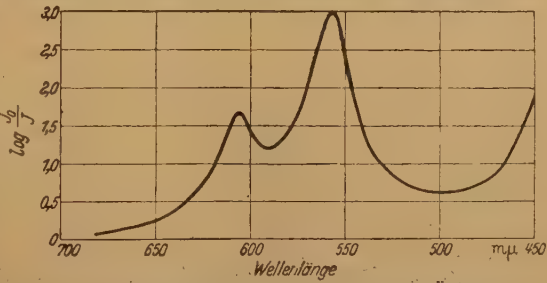


Abb. 2. Porphyrinester aus $Verd_{NO_2}$, aus Äther mit 8 % Salzsäure extrahiert, in salzsaurer Lösung.

Der mit 4% Salzsäure extrahierbare Porphyrinester entsprach nach seinen Extinktionskurven in Salzsäure und Dioxan dem Protoporphyrinester.

Der mit 8% Salzsäure extrahierbare Ester hatte in Salzsäure zwei Banden bei 557 und 605 mμ, die also gegenüber denen des Protoporphyrinesters (550 und 590 mμ) nach Rot verschoben waren (Abb. 2).

Nach Verjagen des Äthers im Vakuum wurde der Ester in Pyridin aufgenommen. Er wies dann ein 4-bandiges Spektrum vom Rhodotyp auf mit Absorptionsmaxima bei 640, 580, 555 und 510 mμ. Die Banden waren also gegenüber denen des Protoporphyrinesters nach Rot verschoben.

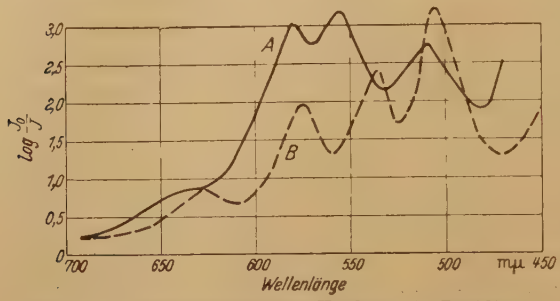


Abb. 3 A. Porphyrinester aus $Verd_{NO_2}$, in Pyridin. B. Gleiche Lösung nach Zusatz von Hydroxylaminhydrochlorid und Natriumkarbonat (Oximbildung).

Wurden zu 10 ccm der Esterlösung 20 mg Hydroxylaminhydrochlorid und 20 mg wasserfreies Natriumkarbonat zugesetzt, so trat sehr schnell eine Farbänderung zu einem helleren Rot ein. Das Absorptionsspektrum hatte sich erheblich geändert. Alle Banden waren nach Blau verschoben worden und hatten jetzt ihre Maxima bei 627, 576, 536 und 503 mμ. Außerdem hatte das Spektrum Ätiotyp angenommen (Abb. 3).

Die Verbindung, die das Oxim des Esters sein dürfte, wurde im Vakuum zur Trockne gebracht und dann in wenigen Kubikzentimeter Essigsäureanhydrid aufgenommen und zum Sieden erwärmt. Nach Abdampfen des Anhydrids im Vakuum wurde wieder in Pyridin aufgenommen. Die Lösung hatte jetzt ein verwaschenes Spektrum vom Rhodotyp, dessen Banden zum Teil wieder nach Rot verlagert waren. Die Absorptionsmaxima befanden sich bei 630, 576, 547, 508 mμ (Abb. 4).

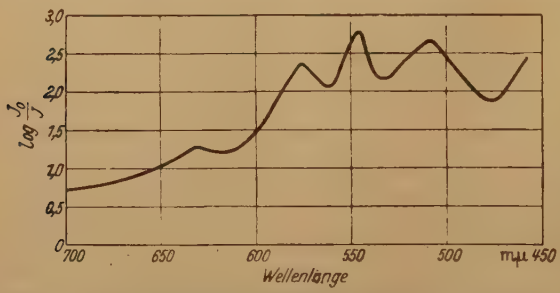


Abb. 4. Oxim des Porphyrinesters aus $Verd_{NO_2}$ (s. Abb. 3, Kurve B), mit Essigsäureanhydrid behandelt und in Pyridin gelöst (Nitrilbildung).

Eine ähnliche Veränderung des Spektrums des Esters in Pyridin wie nach Behandlung mit Hydroxylamin trat nach Zusatz von 1—2 ccm Hydrazinhydrat zu 19 ccm Pyridinlösung ein; allerdings brauchte der Ablauf der Reaktion eine viel längere Zeit als mit Hydroxylamin.

Wurden 10 ccm der Lösung des Porphyrinesters in Pyridin mit 1 Tropfen Benzoylchlorid versetzt, so trat keine Änderung des Spektrums ein. Auch Erwärmung im siedenden Wasserbade oder Vermehrung des Benzoylchlorids konnte keine Reaktion auslösen.

5. *Weitere Ester aus Verd$_{NO_2}$.*

Das aus dem Verdoglobin$_{NO_2}$ abgetrennte Verd ist kein einheitliches Ausgangsmaterial zur Darstellung von Porphyrinestern, wie schon die Anwesenheit von Protoporphyrinester zeigt. Aus der Ätherlösung wurde mit 8%iger Salzsäure noch nicht der gesamte Porphyrinester extrahiert, vielmehr waren darin noch Verbindungen enthalten, die dem Äther erst mit höheren Salzsäurekonzentrationen enzogen wurden. So wurde mit 12%iger Salzsäure ein grüner Farbstoff extrahiert, der in Pyridin aufgenommen ein 4bandiges Spektrum von Ätiotyp zeigt mit Maxima bei 650, 580, 550 und 510 mμ. Behandlung mit Hydroxylamin in Pyridin verschob nur die Banden bei 550 und 510 um wenige mμ nach Blau. Mit Benzoylchlorid keine Reaktion. Wahrscheinlich handelt es sich um ein Gemisch, da die rote Bande zu den übrigen bei den verschiedenen Präparaten nicht in einem konstanten Verhältnis stand. Hinsichtlich ihrer Menge traten diese Verbindungen gegenüber dem Spirographisporphyrin sehr zurück, vorausgesetzt, daß man die spezifische Extinktion der verschiedenen Porphyrine in ihren entsprechenden Maxima als ähnlich annehmen darf. Daß in dieser Fraktion Diformylporphyrinester in erheblicher Menge vorhanden war, ist nicht anzunehmen, da die Banden dieses Porphyrins noch weiter nach Rot verlagert sind als die des Spirographisporphyrins (Fischer und Deilmann [15]).

Zusammenfassung.

Vom Verdoglobin$_{NO_2}$ wurde die prosthetische Gruppe abgetrennt. Aus dem Verd$_{NO_2}$ wurde ein Porphyrinester erhalten, der durch seine Säurelöslichkeit, Lichtabsorption und einige Reaktionen als Spirographisporphyrinester identifiziert wurde. Demnach ist Spirographishäm als prosthetische Gruppe des Verd$_{NO_2}$ anzunehmen.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Hamburg.
(Direktor: Prof. Dr. E. Keeser.)

Zur Frage der narkotischen Wirkung von Steroidhormonen.

Von
Erich Vincke und Dagobert Müller.

(Eingegangen am 29. September 1946.)

Als Narkose bezeichnet man einen mit zeitweiliger Ausschaltung des Bewußtseins verbundenen Zustand, der durch Substanzen herbeigeführt wird, welche eine reversible Lähmung des Z.N.S. mit Ausnahme bestimmter autonomer Zentren bewirken. Als Kriterium der Narkose ergeben sich so Areflexie, Analgesie, Bewußtseinsverlust und Reversibilität. Für zahlreiche Verbindungen verschiedenster Konstitution hat man nachgewiesen, daß ihre narkotische Wirkung von der Lipoidlöslichkeit abhängig ist. Es könnte also lipoidlöslichen Stoffen, wie z. B. den Steroidhormonen, a priori eine narkotische Wirkung nicht abgesprochen werden, obwohl bisher bei Verbindungen dieser Stoffklasse eine solche Eigenschaft nicht bekannt war. Da aber die Hormone allgemein als Biokatalysatoren angesehen werden, welche enzymatische Prozesse der Zelle beschleunigen bzw. ihre Regulation gewährleisten, wirken Angaben einer narkotischen, also lähmenden diesbezüglichen Eigenschaft von Steroidhormonen einigermaßen überraschend.

Im Jahre 1941 veröffentlichte nun Selye seine erste Arbeit [1] über die narkotische Wirkung von einigen Steroidhormonen, der noch drei weitere Publikationen [2-4] folgten. Sie führten zur Aufstellung des „Grundgesetzes der Steroidhormonnarkose", wonach alle Steroide, die eine Hormonwirkung kesitzen, narkotisch wirken und alle hormonal unwirksamen Steroide auch beine Narkotika sind.

Desoxy-corticosteron-acetat wirkte, intraperitoneal injiziert, bereits in einer Dosis von 5 mg bei Ratten (im Mittel 105 g schwer) ausgesprochen narkotisch und im Verhältnis zu den anderen injizierten Hormonen am stärksten, Progesteron wirkte schwächer und gleich stark wie Desoxy-corticosteron-acetat erst bei der dreifachen Dosis, wobei mit beiden Hormonen eine Vollnarkose ohne einleitende Exzitation eintrat. — Androsteron und Testosteron wirkten erst bei höheren Gaben (50 mg), wobei die Narkose langsam mit initialen Krämpfen eintrat. — Andere Präparate wirkten schwächer oder gar nicht: Methyltestosteron (50 mg) wirkte schwächer narkotisch. Diäthyl-stilböstrol und Δ^5-Dehydro-iso-androsteron (50 mg) wirkten nur leicht narkotisch, Δ^5-Pregnen-(3β)-ol-(20)-on und α-Östradiol bewirkten nur eine leichte Depression der Versuchstiere. Äthinyl-testosteron, Pregnan-(3α, 20α)-diol, Cholesterin, Stigmasterin und Δ^4-Cholestenon erwiesen sich als narkotisch unwirksam[1].

[1] Selye, H.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **46**, 116 (1941).

Selye [2] zieht den Schluß, daß es sich um eine Anpassung an eine pharmakologische Wirkung und nicht an einen bestimmten Stoff handle. Später [3] wird die Rolle der Leber bei der Entgiftung von Steroidhormonen behandelt und schließlich [4] abschliessend mitgeteilt, daß Progesteron, Desoxy-corticosteron-acetat, sowie Androgene und Östrogene bei intraperitonealer und intravenöser, jedoch nicht bei subcutaner Injektion eine narkotische Wirkung an Ratten, Mäusen, Meerschweinchen, Kaninchen und Katzen entfalten; dabei soll die Wirksamkeit dieser Stoffe in der genannten Reihenfolge abnehmen *.

In der Literatur konnten an weiteren Angaben über dieses Thema nur noch eine Arbeit von Störtebecker [5] gefunden werden, wonach (bei Mäusen und Kaninchen) im Gegenteil Androgene und Östrogene antinarkotisch zu wirken scheinen, und eine Veröffentlichung von Chamorra [6], der bei intraperitonealer Verabfolgung von Progesteron und Desoxy-corticosteron-acetat an Ratten und Mäusen eine Somnolenz und bei Erhöhung der Dosis eine tiefe Narkose beobachtete **.

Die vorstehend geschilderten Angaben Selyes sind in zweifacher Hinsicht besonders auffällig: einmal steht seine Angabe, daß unter anderem Desoxy-corticosteron und Progesteron stark narkotisch wirken, während Cholesterin und Stigmasterin wirkungslos sind, in Widerspruch zu der Tatsache, daß alle vier Körper nahe verwandter Konstitution lipoidlöslich sind, wie es nach den üblichen Anschauungen über das Zustandekommen einer Narkose gefordert wird. Zum anderen ist sehr merkwürdig, daß die Narkose nur bei intraperitonealer und intravenöser, aber nicht bei subcutaner Applikation eintreten soll.

Falls die Anschauungen Selyes zuträfen, wären sie von außerordentlichem theoretischen Interesse und auch von erheblicher klinischer Bedeutung, zumal wir heute schon über wasserlösliche, intravenös injizierbare Derivate einiger von Selye untersuchten Hormone verfügen.

Aus diesen Gründen wurden die Befunde Selyes nachgeprüft und zugleich ein wasserlösliches, intravenös injizierbares Desoxy-corticosteron-glucosid auf seine etwaige narkotische Wirkung geprüft. Wir gingen bei der letztgenannten Versuchsreihe von der Voraussetzung aus, daß sich bei dieser Applikationsart eine etwaige narkotische Wirkung am schnellsten zeigen mußte.

---

[2] Selye, H.: J. Immunol. (Am.) **41**, 259 (1941). — [3] Selye, H.: J. Pharmacol. (Am.) **71**, 236 (1941). — [4] Selye, H.: J. Pharmacol. (Am.) **73**, 127 (1941). — [5] Störtebecker, T. P.: Klin. Wschr. **1937 I**, 302. — [6] Chamorra, A.: C. r. Soc. Biol. **136**, 391 (1942).

* Über Faktoren, die den Ablauf dieser Anästhesie beeinflussen sollen, berichtet Winter: Endocrinology (Am.) **29**, 790 (1941).

** Nach Edlund und Flyger [Schmerz usw. **14**, 17 (1941)], welche die Resistenz des Organismus gegenüber der Avertinnarkose unter dem Einfluß von Sexualhormonen an männlichen weißen Mäusen untersuchten, wiesen mit Corpus-luteum-Hormon behandelte Tiere eine Resistenzsteigerung auf; bei Behandlung mit Follikelhormon war eine gewisse Resistenzabnahme festzustellen und die Zufuhr von Testikelhormon schließlich war wirkungslos.

Die an Mäusen, Ratten und Kaninchen vorgenommene Prüfung ergab, daß auch bei intraperitonealer Injektion, die neben der subcutanen Applikation gewählt wurde, durch hohe Dosen Testosteron, Östradiol, Progesteron, Nebennierenrindenextrakt oder Desoxy-corticosteron bei den Versuchstieren keinerlei narkotische Effekte der eingangs definierten Art hervorgerufen wurden. Die intravenöse Injektion hoher Dosen Desoxy-corticosteron-glucosid war bei Kaninchen in dieser Hinsicht ebenfalls gänzlich wirkungslos. In allen Fällen traten dagegen bei genügend hohen Dosen der Hormone eindeutige und zum Teil sehr schwere Intoxikationserscheinungen, oft mit letalem Ausgang, auf. Dies war auch bei subcutaner Applikation, im Gegensatz zu den Angaben Selyes, der Fall. Die beobachteten Symptome unterschieden sich von denen der Narkose eindeutig dadurch, daß die Reflexe stets erhalten und leicht auszulösen waren, die gesamte Muskulatur tonisch blieb, keine Analgesie auftrat und daß sich kein Bewußtseinsverlust zeigte.

Wir haben selbstverständlich auch auf eine etwaige narkotische Wirkung des Lösungsmittels geachtet. Sie käme z. B. bei dem von Selye verwendeten Propylenglykol in Betracht, dessen narkotische Wirkung bekannt ist. Einen solchen Effekt beobachteten wir dementsprechend in Versuchen an Mäusen und Ratten bei dem statt dessen von uns verwendeten Äthylenglykol. Die anderen Lösungsmittel (Erdnuß- oder Sesamöl) blieben jedoch bei Mäusen, Ratten und Meerschweinchen völlig wirkungslos. Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen den Angaben Selyes und unseren eigenen Befunden vermögen wir nicht zu geben.

Experimenteller Teil.

1. Prüfung der Lösungsmittel.

Als erstes Lösungsmittel wurde das Erdnußöl geprüft. Es wurde erwachsenen Mäusen, Ratten und Meerschweinchen in Gruppen von je 10 Tieren sowohl subcutan als auch intraperitoneal in 4 Injektionen zu je 0,25 ccm (Maus), 0,50 ccm (Ratte) und 1,5 ccm (Meerschweinchen) im Abstand von je 30 Min. appliziert. Die Dosen für die einzelnen Tierarten betrugen im Mittel 0,06 ccm pro g Maus, 0,025 ccm pro g Ratte und 0,016 ccm Öl pro g Meerschweinchen. Die intraperitoneal gespritzten Tiere verhielten sich grundsätzlich nicht anders als die subcutan geimpften. Alle Tiere zeigten während der Beobachtungszeit (von mehreren Stunden) keinerlei Somnolenz- oder Erschlaffungserscheinungen. Die Freßlust war stets unvermindert, Flucht- und Abwehrreflexe waren leicht und prompt durch Kneifen in den Schwanz und Ziehen an den Schnauzenhaaren auszulösen.

Da verschiedene Hormone in Sesamöl gelöst waren, wurde dieselbe Versuchsreihe mit diesem Öl durchgeführt, wobei auch die injizierten Dosen gleich hoch waren. In dieser Versuchsreihe zeigten sich keine Unterschiede zum Erdnußöl. Das Sesamöl wurde ebensogut vertragen; es waren auch keinerlei Zeichen einer Somnolenz festzustellen. Dagegen zeigte sich eine leichte Schockwirkung bei den Tieren der intraperitoneal behandelten Gruppen, die durch die Einbringung größerer Mengen Öl in die Bauchhöhle hervorgerufen zu werden scheint. (Dieser Effekt wurde auch schon beim Erdnußöl beobachtet.) Verglich man unbehandelte Kontrolltiere mit den

behandelten Tieren, so hatte man sogar den Eindruck, als wenn jene weit ruhiger als diese seien, die durch den Injektionsreiz und die Fremdkörperwirkung des Öles stets aufs neue erregt wurden.

In seiner ersten Arbeit nennt SELYE als nicht ölartiges Lösungsmittel für die verwandten Hormone das Propylenglykol, eine Verbindung, deren narkotische Wirkung etwa $^1/_3$ von derjenigen des Äthylalkohols beträgt [7]. Da das Propylenglykol für unsere Versuche leider nicht zugänglich war, wurde statt dessen das Äthylenglykol verwendet.

HANZLIK, SEIDENFELD und JOHNSON [8] fanden bei dieser Verbindung als minimale letale Dosis bei intramuskulärer Injektion an Ratten und Kaninchen 4,4 bzw. 6,6 g/kg und bei intravenöser Applikation 2,2 bzw. 3,3 g/kg Körpergewicht. v. OETTINGEN und JIROUCH [9] bestimmten die tödliche Grenzdosis für die Maus bei subcutaner Injektion zu 2,5 ccm/kg. Bei intraperitonealer Applikation fand schon früher PAGE [10] für Ratten 2,5 und für Kaninchen 9,0 ccm/kg. Bezüglich weiterer Zahlenangaben über die Toxizität vgl. LEHMANN und FLURY [11]. Als Symptome, die dem Tode vorausgehen oder die bei hohen, nicht letalen Dosen auftreten, wurden Gleichgewichts- und Bewegungsstörungen bis zur leichten Narkose, in einzelnen Fällen auch Auftreten von Krämpfen beobachtet. — Über eine Vergiftung am Menschen, die mit tiefer Narkose und tagelang anhaltender Bewußtseinstrübung verbunden war, berichtet HANSEN [12].

Aus den angegebenen Zahlen folgt, daß das Äthylenglykol toxischer als das Propylenglykol ist: Für das Propylenglykol wurde die letale Grenzdosis bei intramuskulärer Injektion an Ratten zu 15,7 g [13] bzw. 14,7 g [14] pro kg Körpergewicht, bei subcutaner Injektion zu 23,1 g [7] und bei intravenöser Applikation zu 16,8 g/kg Körpergewicht [14] bestimmt.

In unseren Versuchen, welche die Angaben der obengenannten Autoren bestätigen, wurde Äthylenglykol (chemisch rein) als 10%ige Lösung in destilliertem Wasser verwendet. Gruppen von je 10 erwachsenen Mäusen oder Ratten (im Gewicht von 18—26 bzw. 87—115 g) erhielten 2 Injektionen zu je 0,025 bzw. 0,125 ccm Äthylenglykol subcutan oder intraperitoneal im Abstand von je 30 Min. injiziert, so daß jedes Tier 0,05 (Maus) bzw. 0,25 ccm (Ratte) erhielt. Die Tiere begannen nach etwa 15 Min. (bei subcutaner Applikation) bzw. nach wenigen Min. (bei intraperitonealer Injektion) schläfrig zu werden. Sie reagierten auf akustische Reize nicht mehr. Selbst bei einer Dosis, die nur der Hälfte der letalen Dosis entsprach, zeigten sich schon frühzeitig Symptome einer schweren Intoxikation, die besonders das Nervensystem in Mitleidenschaft gezogen hatte: Bewegungsarmut, torkelndes Laufen, klonische Krämpfe und völlige Interesselosigkeit an Umwelt und Futter. Nach Applikation der letalen Dosis (2,50 ccm/kg Körpergewicht) kam es schon nach kurzer Zeit zum Erliegen der lebenswichtigen Funktionen; der Tod trat unter lang anhaltenden klonischen Krämpfen durch Versagen des Kreislaufes ein. Die Reflexe waren während dieser Zeit nur schwer und wenig ergiebig auszulösen.

Nach diesen Befunden erscheint es berechtigt, das Äthylenglykol als Lösungsmittel bei der Wertbestimmung von Hormonen abzulehnen, da die

---

[7] LEHMAN, A. J. and H. W. NEWMAN: J. Pharmacol. (Am.) **60**, 312 (1937). — [8] HANZLIK, P. J., M. A. SEIDENFELD and C. C. JOHNSON: J. Pharmacol. (Am.) **41**, 387 (1931). — [9] OETTINGEN, W. F. v. and E. A. JIROUCH: J. Pharmacol. (Am.) **42**, 355 (1931). — [10] PAGE, J. H.: J. Pharmacol. (Am.) **30**, 313 (1927). — [11] LEHMANN, K. B. u. F. FLURY: Toxikologie und Hygiene der technischen Lösungsmittel, S. 123. Berlin: Springer 1938. — [12] HANSEN, K.: Slg Vergift.fälle **1**, A 77 (1930). — [13] BRAUN, H. A. and G. F. CARTLAND: J. amer. pharmaceut. Assoc. **25**, 746 (1936). — [14] SEIDENFELD and HANZLIK: J. Pharmacol. (Am.) **44**, 109 (1932).

Wirkung der auszutestenden Substanz von der Wirkung des Äthylenglykols in unkontrollierbarer Weise überlagert wird. Da das Propylenglykol trotz seiner größeren Ungiftigkeit ebenfalls narkotisch wirksam ist, gilt dieser Schluß unseres Erachtens auch für diese Verbindung, sobald es sich um die Prüfung einer etwaigen narkotischen Wirkung von Hormonen handelt.

2. Prüfung der Hormone.

Die Versuche wurden an Mäusen, Ratten und Kaninchen ausgeführt. Es wurde die Wirkung von Testosteron-propionat, Östradiol-benzoat, Progesteron, Nebennierenrindenextrakt, Desoxy-corticosteron-acetat und Desoxy-corticosteron-glucosid geprüft. Diese Verbindungen wurden im allgemeinen in 2 Injektionen jeweils subcutan oder intraperitoneal (das Desoxy-corticosteron-glucosid bei Kaninchen intravenös) im Abstand von 30 Min. ausgewachsenen Mäusen von durchschnittlich 20—25 g, Ratten von 100—250 g und Kaninchen von 2000—2500 g Gewicht appliziert. Daneben wurden zur Erreichung höherer Einzeldosen oft auch Ratten von im Mittel 40—70 g Gewicht verwendet. Für jede Dosis und Applikationsart wurden stets Gruppen von 10 Mäusen bzw. mindestens 5 Ratten benutzt.

Das Testosteron-propionat („Testoviron", „Perandren") erhielten Mäuse und Ratten in Dosen von 0,12 oder 0,26 mg*. Vom Östradiol-benzoat („Progynon B oleosum forte") wurden Ratten 0,17 mg appliziert. Progesteron („Proluton") wurde Mäusen in Dosen von 0,24 oder 0,70 mg und Ratten in Dosen von 0,11 mg verabfolgt. Vom Nebennierenrindenextrakt („Cortidyn") erhielten Mäuse 0,024 ccm, Ratten 0,012 oder 0,048 ccm. Desoxy-corticosteron-acetat („Percorten") wurde Mäusen in Mengen von 0,11 mg und Ratten in Dosen von 0,02, 0,06 oder 0,15 mg injiziert. Vom Desoxy-corticosteron-glucosid („Percorten wasserlöslich") wurden Ratten 0,04 oder 0,07 mg und je 2 Kaninchen 0,01 oder 0,03 mg sowie je einem Kaninchen 0,04 oder 0,09 mg appliziert.

* Alle Dosierungsangaben sind Mittelwerte und beziehen sich auf 1 g Körpergewicht.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Die Reduktion des Hämiglobins.

V. Mitteilung *.

Beschleunigung durch Erhöhung der Milchsäurekonzentration des Blutes.

Von

MANFRED KIESE.

(Eingegangen am 25. Oktober 1946.)

Die enzymatische Reduktion des Hämiglobins in den roten Zellen ist unter anderem von der Konzentration der für die Fermentsysteme erforderlichen Substrate Glukose und Milchsäure abhängig (KIESE [1]). Bei einer Konzentration von 100 mg Glukose in 100 ccm Blut sind die entsprechenden Fermentsysteme weitgehend gesättigt. Durch Erhöhung der Glukosekonzentration wird daher die Reduktion des Hämiglobins durch diese Fermente nicht mehr nennenswert beschleunigt. Die Milchsäuredehydrase der roten Zellen ist aber erst bei Konzentrationen zwischen 50 und 100 mg Milchsäure in 100 ccm Blut zur Hälfte gesättigt. Im Blute verschiedener Tiere (Mensch, Hund, Katze) ist die Milchsäurekonzentration geringer. Es war anzunehmen, daß man bei diesen Tieren die Reduktion des Hämiglobins, durch Erhöhung der Milchsäurekonzentration beschleunigen könnte. Wir haben diese Beschleunigung beobachtet, als wir Hunden, die mit m-Dinitrobenzol vergiftet waren, große Dosen von Laktat injizierten.

m-Dinitrobenzol bewirkt in Dosen von 10 mg je Kilogramm beim Hunde eine lang anhaltende Hämiglobinbildung und Erhöhung der Hämiglobinkonzentration im Blute (KIESE [2]). Im Laufe von durchschnittlich 12 Stunden wird die Hämiglobinkonzentration auf $50 \pm 3\%$ des Gesamtfarbstoffes erhöht, beträgt nach 24 Stunden im Mittel noch $27{,}7 \pm 2{,}8\%$ und kehrt im Laufe von 50 ± 4 Stunden wieder in den Bereich normaler Konzentrationen zurück. Durch die Injektion von Laktat wurde sowohl der Anstieg der Hämiglobinkonzentration vermindert als auch ihre Rückkehr zu normalen Werten beschleunigt.

Versuchsergebnisse.

Die Methoden der Blutuntersuchung sind an anderer Stelle angeführt (KIESE [2]). m-Dinitrobenzol wurde den Hunden in 2%iger Lösung in Olivenöl

* 4. Mitt. s. Arch. exper. Path. (D.) **204**, 288 (1947).

[1] KIESE, M.: Biochem. Z. **316**, 264 (1944). — [2] KIESE, M.: Arch. exper. Path. (D.) (im Druck).

Tabelle 1. *Ablauf der Vergiftung von Hunden mit 10 mg/kg*

Hund Nr.	Gew. kg	Injektion von Na-Laktat nach der Injektion von m-Dinitrobenzol		Blutfarbstoffkonzentration g/100 ccm Blut		Blutfarbstoff	
		Dosis in g	Stunden	vor der Injektion	nach 2 Tagen	Minimum g/100 ccm	Zeit nach der Injektion in Tagen
36	16,0	10	6	17,6	9,0	8,5	7
37	21,0	10	6	12,7	7,5	4,7	5
38	15,5	5	5	17,5	12,5	9,4	6
39	8,5	5	4	11,5	6,4	5,0	2
39	8,5	5	5	17,8	11,5	10,4	5
40	24,5	10	3 u. 8	12,0	9,4	9,4	2
41	23,6	10	3 u. 8	11,5	9,5	6,7	8
42	20,5	5	7	14,5	8,5	8,5	2
43	24,5	5	3	11,0	9,1	9,1	2
45	14,5	5	12	10,6	8,4	4,5	7

in einer Dosis von 10 mg je Kilogramm an vier Stellen unter die Haut gespritzt. Natriumlaktat wurde in Dosen von 5—10 g je Tier in 50%iger Lösung nach Neutralisation mit Kohlensäure zu verschiedenen Zeiten sehr langsam in eine Beinvene gespritzt.

Der Ablauf der m-Dinitrobenzolwirkung unter dem Einfluß der Milchsäure ist aus den Daten der Tabelle 1 ersichtlich.

Aus Gründen, die früher ausführlich erörtert wurden, interessiert beim Hämiglobingehalt vornehmlich sein Verhältnis zum Gesamtblutfarbstoffgehalt. Die Hämiglobinkonzentration erreicht im Mittel einen Wert von $39 \pm 1{,}5\%$ des Gesamtblutfarbstoffgehaltes und beträgt 24 Stunden nach der Injektion des Dinitrobenzols noch $19 \pm 2{,}8\%$. Die Rückkehr in den Bereich normaler Konzentrationen erfolgt in $46{,}8 \pm 3{,}6$ Stunden. Diese Werte sind alle eindeutig niedriger als die oben angeführten entsprechenden Werte bei der unbeeinflußten Vergiftung. Das Laktat wurde zu verschiedenen Zeiten injiziert. Es ist innerhalb der Streuung der Ergebnisse nicht zu erkennen, welcher Zeitpunkt der günstigste ist. Die großen Dosen (10 g je Tier) und die wiederholte Injektion scheinen stärker zu wirken als die kleinen.

Die beschleunigende Wirkung des Laktats auf die Reduktion des Hämiglobins ist eben nachweisbar. Sie ist nicht vergleichbar der starken beschleunigenden Wirkung einiger Farbstoffe [3].

Es wäre daran zu denken, daß die Erniedrigung der Hämiglobinkonzentration durch eine Hemmung der Hämiglobinbildung bedingt wurde. Doch ist über unmittelbare Reaktionen von Hämiglobin bildenden Stoffen

[3] KIESE, M.: Arch. exper. Path. (D.) **204**, 288 (1947).

m-Dinitrobenzol unter dem Einfluß von großen Dosen Natriumlaktat.

Hämiglobin		Anteil des Hämiglobins am Gesamtblutfarbstoff		Rückkehr zur Norm nach Stunden	Heinz-Körper		Tod nach Tagen
Höchste Konzentration g/100 ccm	Zeit nach Injektion	zur Zeit der maximalen Hämiglobinkonzentration	nach 24 Stunden		Prozent der roten Zellen	Zeit nach der Injektion Stunden	
5,0	12	45	9	36	65	48	Staupe, getötet
4,5	12	40	20	48	100	48	9
4,6	12	30	30	72	90	72	Staupe, getötet
3,6	8	40	28	36	25	48	—*
5,1	10	35	20	48	60	72	—**
4,7	9	40	9	48	30	48	7
4,1	13	40	8	36	30	48	9
4,2	15	35	25	60	50	24	—
4,5	20	45	11	48	22	48	—
4,0	14	40	30	36	45	72	11

mit Milchsäure nichts bekannt, während die Beschleunigung der Reduktion des Hämiglobins durch Erhöhung der Milchsäurekonzentration nach der Kenntnis der Kinetik der enzymatischen Reduktion von Hämiglobin durch Milchsäure zu erwarten ist.

In der Tabelle 1 sind noch eine Reihe weiterer Daten enthalten, die zu dem vorigen Problem nicht in unmittelbarer Beziehung stehen. Sie erlauben eine Beurteilung des Einflusses des Laktats auf andere Wirkungen des m-Dinitrobenzols. Die tödliche Wirkung des m-Dinitrobenzols wurde durch Laktat nicht beeinträchtigt. Von 10 Tieren starben 4, während bei der unbeeinflußten Wirkung 9 von 19 starben. Krämpfe wurden nur bei 2 Tieren beobachtet. Obgleich die Bildung von Heinz-Körpern etwa im gleichen Ausmaße vorhanden war, trat bei den mit Laktat behandelten Tieren eine stärkere Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration ein, nämlich im Mittel 6,1 $\pm$ 0,7 g je 100 ccm gegenüber 4 $\pm$ 0,3 bei den unbehandelten. Ob diese verminderte Beständigkeit der roten Zellen auf einer Störung ihres Stoffwechsels durch die hohen Laktatkonzentrationen oder einer Verbesserung der Aufnahmefähigkeit des Retikuloendothels beruht, wäre noch näher zu prüfen.

Zusammenfassung.

Während der Hämiglobinbildung durch m-Dinitrobenzol bei Hunden konnte die Hämiglobinkonzentration im Blute gesenkt und schneller wieder zu normalen Werten gebracht werden, wenn die Milchsäurekonzentration im Blute durch wiederholte Injektion großer Dosen von Milchsäure erhöht wurde.

* Nach 1 Tage Beginn von leichten Krämpfen, die 4 Tage anhielten.
** Nach 10 Tagen Beginn von schweren Krämpfen, die 3 Tage anhielten.

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Greifswald
(Direktor: Prof. Dr. F. A. Hoppe-Seyler †).

Untersuchungen über Cholinesterase im Blut nach experimentellen Schädigungen.

I. Mitteilung.

Bestimmungsmethode und Einfluß von Narkose, operativen Eingriffen und Blutentnahmen.

Von

Norbert Schümmelfeder.

Mit 9 Textabbildungen.

(Eingegangen am 11. September 1946.)

Bei der Durchführung von Untersuchungen über das Verhalten körpereigener, kreislaufwirksamer Stoffe während und nach lokalen und allgemeinen Schädigungen (Erfrierung, Verbrennung, Trauma, Ischämie usw.) zeigte sich, daß Angaben über das Verhalten der Cholinesterase im Blut bei diesen Zuständen — abgesehen von einigen Beobachtungen beim experimentellen traumatischen Schock und bei Nervenreizung[1], welche uns erst im Laufe der eigenen Untersuchungen bekannt wurden, fehlen.

In den Fällen, bei welchen nach experimentellen Schädigungen von genügender Stärke und Dauer schwere Störungen der Kreislaufregulation und schließlich Schockzustände auftreten, mußte daran gedacht werden, daß hierbei Änderungen der Aktivität oder der Menge der Cholinesterase im Blut ursächlich eine Rolle spielen könnten.

In verschiedenen Versuchsreihen, über welche später berichtet werden soll, wurde diese Frage verfolgt. Es erschien uns zunächst wichtig zu erklären, ob durch die bei den Hauptversuchen unvermeidlichen operativen Eingriffe und durch die Narkose stärkere Schwankungen der Cholinesterase-Aktivität (EA) hervorgerufen werden. Die Versuchsanordnung, sowie die Technik und Fehlergröße der Esterasebestimmungen werden in der vorliegenden Mitteilung angegeben. Gleichzeitig werden die Versuche besprochen, welche den Einfluß vorbereitender operativer Eingriffe und den der Narkose klarstellen sollen.

Methodik.

Alle Versuche wurden an Hunden über 9,5 kg durchgeführt. In allen Fällen wurden A. und V. brachialis auf einer Seite freigelegt und am zentralen Teile mit

[1] Frommel, E., M. Thalheimer, A. D. Herschberg u. I. Piquet: Helvet. physiol. Acta 1, 451 (1943).

Kanülen versehen. Der Blutdruck wurde mit dem Quecksilbermanometer an einer Karotiskanüle gemessen und während der Dauer der Versuche aufgezeichnet. Die Esterasebestimmungen führten wir teils im hämolysierten Vollblut, teils im Serum durch. Die Größe der einzelnen Blutentnahmen lag meist zwischen 20 und 40 ccm. Nur bei einigen Versuchen, über welche an anderen Orten besonders berichtet wird, bei welchen neben den Esteraseauswertungen noch weitere Bestimmungen ausgeführt wurden, waren die Mengen gelegentlich größer.

Die Aktivität der Cholinesterase wurde nach GLICK[2] an der Glaselektrode titrimetrisch gemessen. Diese Methode, welche von uns in Einzelheiten etwas abgeändert wurde, erwies sich für die beabsichtigten Untersuchungen als die geeignetste. Die biologischen Auswerteverfahren mit ihrer Verwendung von niedrigen Substrat- und hohen Fermentkonzentrationen haben den Nachteil, daß das Ferment nicht unter optimalen Bedingungen einwirken kann; damit läßt sich nur schlecht eine reproduzierbare Einheit des Ferments erreichen (FABER[3]). Die titrimetrische Bestimmung nach STEDMAN und EASSON[4] oder VAHLQUIST[5] sind ebenso wie die stufenphotometrische Methode von ABDON und UVNÄS[6] in stärker hämolysiertem Blut nicht recht brauchbar. Die gasometrische Methode von AMMON[7] konnte nicht benutzt werden, da jede Einzelprobe sofort nach der Entnahme ausgewertet werden sollte.

Wir benutzten die niederohmige Kölbchenglaselektrode Nr. 9000 von Schott u. Gen. mit n/10 HCl-Füllung und Chinhydron-Pt-Ableitung. Vergleichselektrode war die gesättigte Kalomel-Elektrode, Meßinstrument ein Kompensationsgerät in Verbindung mit einem Spiegelgalvanometer.

Als Substrat dienten 40 ccm 0,2%ige Azetylcholinchloridlösung (Azetylcholinchlorid „Roche") in redestilliertem Wasser. Diese Lösung wurde täglich frisch angesetzt, ihr wurde im Reaktionsgefäß 0,4 bzw. 0,5 ccm Vollblut oder Serum zugesetzt. Beim Einbringen des Vollblutes in die Substratlösung trat sofort Hämolyse ein. Es wurde somit im hämolysierten Blut die Summe der Wirkung der Erythrozyten- und der Plasma- bzw. Serumesterase, in den Serumproben nur die Wirkung der letzten bestimmt. Um den Einfluß von CO_2 auszuschalten und um die Reaktionsflüssigkeit dauernd zu mischen, wurde ein N_2-Strom durch das Reaktionsgemisch geleitet (entsprechend dem Vorgehen von KUNST und BERKELBACH v. D. SPRENKEL[8] bei elektrometrischen Analysen anderer Art). Zur Vermeidung des Schäumens setzten wir 5 Tropfen sekundären Oktylalkohol zu. In Vorversuchen wurde festgestellt, daß weder Oktylalkohol noch Stickstoff die EA beeinflussen.

Die Auswertungen selbst erfolgen bei einem praktisch konstant gehaltenen p_H von 8,4, dem Reaktionsoptimum der Cholinesterase (GLICK, s. oben), bei konstanter Temperatur von 25° (Temperaturoptimum der Glaselektrode). Auch die Substratlösungen hatten 25°. Die Einzelbestimmung dauerte 30 Min. (Stoppuhr). Vor Beginn der Auswertung wurde das p_H des Reaktionsgemisches durch einige Tropfen n/50 NaOH auf 8,4 eingestellt, dann wurde während der Auswertung entsprechend der Essigsäurebildung tropfenweise n/50 NaOH zugesetzt. Die zugefügten Mengen wurden alle 5 Min. abgelesen und notiert. Die Azetylcholinspaltungskurve hatte bei diesem Vorgehen in jedem Fall (bei einer Gesamtzahl von über 800 Auswertungen) einen linearen Verlauf. Die Cholinesterasewirkung wurde ausgedrückt in „%-Einheit", d. h. in Werten, welche sich ergeben, wenn man berechnet, wieviel Prozent des zugesetzten Azetylcholinchlorids jeweils fermentativ — nach Abzug der Eigenhydrolyse — in 30 Min. gespalten wurden.

---

[2] GLICK, D.: Biochem. J. (Brit.) **31**, 521 (1937). — [3] FABER, M.: Studier over Serumcholinesterasens Variationer. Diss. Kopenhagen 1941. — [4] STEDMAN, E., E. STEDMAN u. L. E. EASSON: Biochem. J. (Brit.) **26**, 205 (1932). — [5] WAHLQUIST, BO.: Scand. Arch. Physiol. **72**, 133 (1935). — [6] ABDON, N.-O. u. B. UVNÄS: Scand. Arch. Physiol. **76**, 1 (1937). — [7] AMMON, R.: Pflügers Arch. **233**, 486 (1934). [8] KUNST, H. u. BERKELBACH v. D. SPRENKEL: Biochem. Z. **309**, 77 (1941).

Für die kurvenmäßige Darstellung setzten wir den letzten Esterasewert vor Einsetzen der experimentellen Schädigung gleich 100%. Die sich ergebenden prozentualen Abweichungen wurden dann in das Koordinatensystem eingetragen.

Den Aufbau der Apparatur zeigt Abb. 1.

Die gesamte Einrichtung, einschließlich auch der elektrischen Meßgeräte besteht aus Teilen, wie sie üblicherweise in Laboratorien zur Verfügung stehen. Hierin ist ein Vorteil zu sehen gegenüber denjenigen Verfahren, zu deren Ausführung Spezialapparaturen notwendig sind.

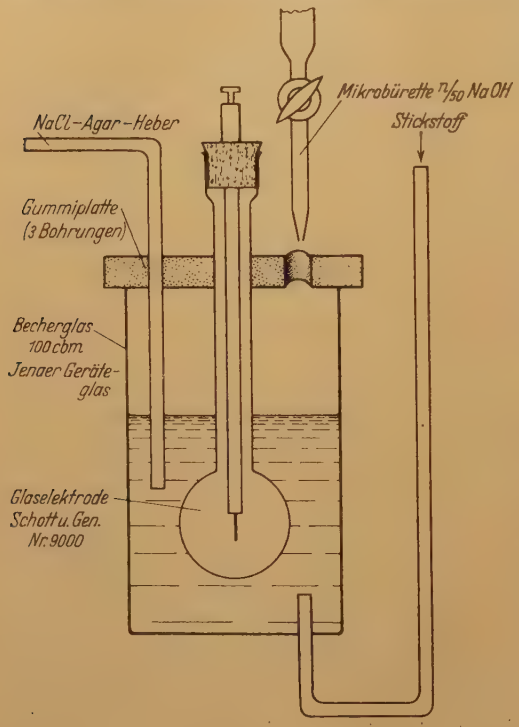


Abb. 1.

Die Bestimmungsdauer würde sich übrigens ohne größere Fehler auf 15 Min. (3 Messungswerte!) verkürzen lassen. Hiervon wurde bisher abgesehen, um etwaige Titrationsfehler bei der größeren Zahl der Meßwerte besser kontrollieren zu können. Aus dem gleichen Grund wurden regelmäßig Doppelbestimmungen ausgeführt.

Die Genauigkeit des Verfahrens ergibt sich aus der folgenden Übersicht (Tabelle 1), zu welcher Parallelmeßwerte in verschiedenen Vollblutproben (VB) bzw. Serumproben (S) zusammengestellt sind.

In Normalblut- bzw. Serumproben blieben in allen darauf untersuchten Fällen die erhaltenen Werte innerhalb dieser Fehlergrenzen, auch wenn die Bestimmungen nach Aufbewahren der Proben bei $+4^0$ unter Thymolzusatz nach 3—4 Tagen noch einmal ausgeführt wurden. Bei Vollblut- und Serumproben geschädigter Versuchshunde war das aber nicht immer so; hier wurden gelegentlich schon wenige Stunden nach der Entnahme erhebliche Abweichungen von den zuerst erhaltenen Werten beobachtet. Auf die Frage, wie diese Schwankungen im nicht normalen Blut zu erklären sind, wird später an anderer Stelle eingegangen werden. Auf Grund dieser Beobachtungen wurde daran festgehalten, die Auswertungen unmittelbar nach der Blutentnahme durchzuführen.

Einfluß von Narkose, operativen Eingriffen und Blutentnahmen.

Da — entgegen einigen Literaturangaben (vgl. AHLMARK und KORNERUP[9] — unter der Einwirkung von Pernocton bzw. Pernocton-Chloralose

[9] AHLMARK, A. u. T. G. KORNERUP: Scand. Arch. Physiol. 82, 39 (1939).

Tabelle 1.

p_H 8,4.

Vollblut (VB)- und Serum (S)-Proben (Hund)	%-Einheiten	M	f	fm	fw
VB_1	2,87	2,90	— 0,03	± 0,05	± 0,03
VB_1	2,87		— 0,03		
VB_1	2,96		+ 0,06		
VB_2	2,14	2,31	— 0,17	± 0,14	± 0,09
VB_2	2,28		— 0,03		
VB_2	2,37		+ 0,06		
VB_2	2,46		+ 0,15		
VB_3	3,82	3,84	— 0,02	± 0,09	± 0,06
VB_3	3,78		— 0,06		
VB_3	3,78		— 0,06		
VB_3	3,96		+ 0,12		
VB_4	3,19	3,15	+ 0,04	± 0,08	± 0,05
VB_4	3,19		+ 0,04		
VB_4	3,06		— 0,09		
S_1	3,91	4,00	— 0,09	± 0,13	± 0,09
S_1	4,09		+ 0,09		
S_2	3,78	3,69	+ 0,09	± 0,13	± 0,09
S_2	3,59		— 0,10		
S_3	3,59	3,61	— 0,02	± 0,03	± 0,02
S_3	3,63		+ 0,02		
S_4	3,07	3,19	— 0,12	± 0,10	± 0,07
S_4	3,25		+ 0,06		
S_4	3,25		+ 0,06		
S_5	3,50	3,60	— 0,10	± 0,10	± 0,07
S_5	3,70		+ 0,10		
S_5	3,61		— 0,01		
S_6	4,06	4,03	+ 0,03	± 0,05	± 0,03
S_6	4,06		+ 0,03		
S_6	3,97		— 0,06		
S_7	8,04	7,98	+ 0,06	± 0,08	± 0,05
S_7	7,92		— 0,06		
S_8	5,95	6,04	— 0,09	± 0,13	± 0,09
S_8	6,13		+ 0,09		
S_9	6,72	6,75	— 0,03	± 0,04	± 0,03
S_9	6,77		+ 0,02		
S_{10}	8,49	8,49	± 0,00	± 0,00	± 0,00
S_{10}	8,49		± 0,00		

doch Schwankungen der Esteraseaktivität vorkommen, wurde besonders geprüft, innerhalb welcher Grenzen mit derartigen Schwankungen gerechnet werden muß. Gleichzeitig untersuchten wir, welchen Einfluß die vorbereitenden operativen Eingriffe (Freilegung der Gefäße usw.), mehrfach wiederholten Blutentnahmen in der oben angegebenen Größe und schließlich größere Blutverluste bis zum Tod des Versuchstieres haben.

v. VEREBÉLY[10] beobachtete Senkungen der Aktivität im Vollblut des Menschen, PIROLLI[11] Steigerungen im Serum bei Hunden nach größeren Blutverlusten.

Die Ergebnisse der Versuche werden anschaulich gemacht durch die folgenden Abbildungen. Es handelt sich dabei um typische Kurvenabläufe, welche aus einer größeren Zahl ausgewählt werden.

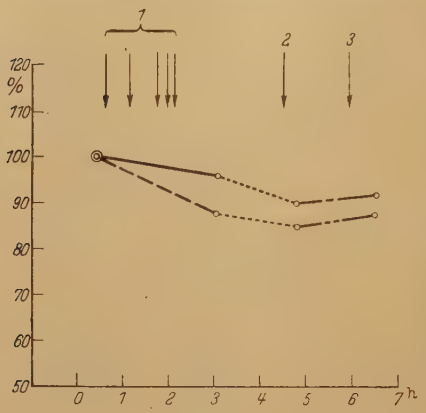


Abb. 2. —— venöses Serum; — — — venöses Vollblut; —·— arterielles Serum; —··— arterielles Vollblut von Hund 32; *1* subcutane Injektion von 2 ccm Pernocton, intravenöse Injektion von 65 mg Chloralose, subkutane Injektion von 40 mg Chloralose, intravenöse Injektion von 15 mg Chloralose, subkutane Injektion von 20 mg Chloralose; *2* Freilegung der Art. und Ven. brach. links; *3* Freilegung der Art. carotis rechts.

Die Abb. 2, 3, 6 und 7 zeigen, daß in den Blutproben, welche vor Beginn der Narkose entnommen wurden, sowohl im Vollblut, wie im Serum die

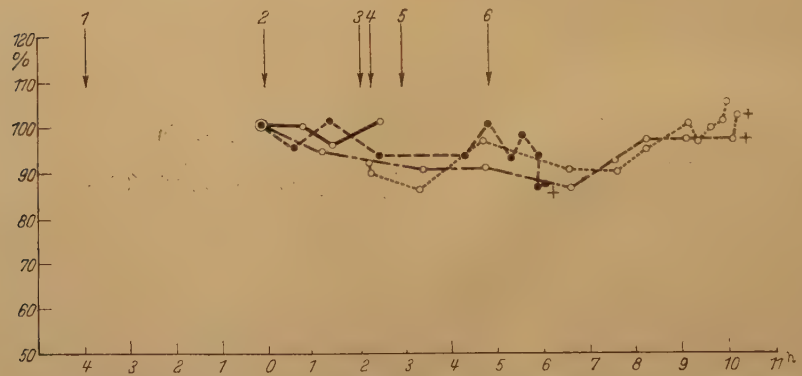


Abb. 3. —— venöses Serum, — — — arterielles Serum von Hund 41; —·— venöses Serum, ----- arterielles Serum von Hund 42; *1* subkutane Injektion von 5 ccm Pernocton bei Hund 41; *2* subcutane Injektion von 5 ccm Pernokton, *3* Freilegung der Art. und Ven. brach. li., *4* Freilegung der Art. carotis re., *5* Freilegung der Ven. fem. li., *6* intravenöse Injektion von 50 mg Chloralose bei Hund 42; + nach dem Tod entnommene Blutproben.

Werte in allen Fällen außerhalb der Fehlergrenze der Bestimmung höher lagen, als in den nächsten Proben nach Einsetzen der Narkose, gleichgültig ob Pernocton und Chloralose einzeln oder zusammen angewandt wurden. Die Narkose führt also im Beginn zu einer Senkung der EA (mindestens 4% im Serum bzw. 12% im Vollblut; höchstens 12% im Serum bzw.

[10] VEREBÉLY, T. v.: Klin. Wschr. **1937 I**, 851. — [11] PIROLLI, M.: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **17**, 437 (1942).

41% im Vollblut). Das steht im Gegensatz zu den obenerwähnten Beobachtungen von AHLMARK und KORNERUP (s. oben). Ob die Größe der Senkung von der Menge des injizierten Narkotikums abhängt, wurde nicht näher untersucht, da es uns nur darauf ankam, die Wirkung derjenigen Mengen, welche wir bei Schockversuchen verwenden mußten, festzustellen. Die Abb. 6 und 7 zeigen, daß die dort auftretenden stärkeren Senkungen sich nach etwa 2 Stunden wieder ausgleichen, in den übrigen Fällen ist der Kurvenverlauf noch wesentlich gleichmäßiger. Schwankungen der EA im Blut sind also jedenfalls nicht mehr auf Narkoseeinflüsse zurückzuführen, wenn sie mehr als 2 Stunden nach der letzten Injektion auftreten. Unmittelbar im Anschluß an Chloraloseinjektionen und Blutentnahmen wurden gelegentlich rasch vorübergehende stärkere Senkungen der EA beobachtet (vgl. Abb. 6), nach Pernocton wurden Schwankungen bei bereits bestehender Narkose nicht gefunden (Abb. 7). Im 1. Fall handelt es sich meist um kleine Versuchstiere, welche auf Blutentnahmen mit verhältnismäßig starken Blutdruckschwankungen reagieren.

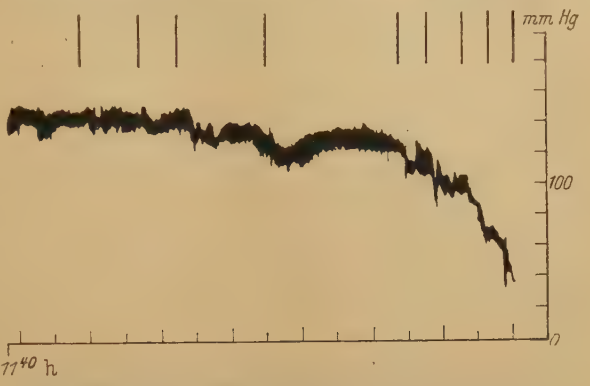


Abb. 4. Blutdruck bei wiederholten Aderlässen. Hund 41. 18,5 kg, 22. 11. 1943; Blutentnahmen von je 30—60 ccm an den einzelnen Marken. Entnommene Gesamtmenge 450 ccm Blut. Zeitmarkierung 30 Min.

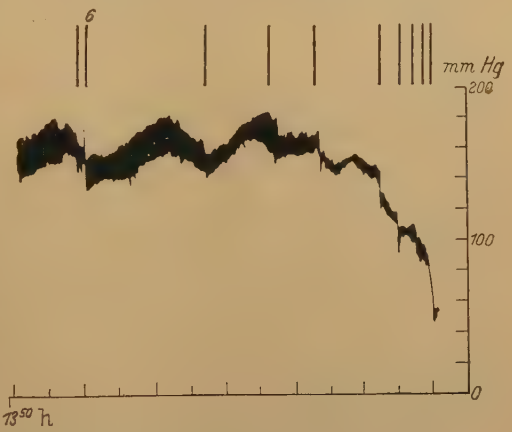


Abb. 5. Blutdruck bei wiederholten Aderlässen. Hund 42, 12,5 kg, 30. 11. 1943; Blutentnahmen von je 20—35 ccm. Entnommene Gesamtmenge 275 ccm. Vor Beginn der Blutdruckschreibung waren bereits weitere 75 ccm Blut in Einzelportionen von 5—15 ccm entnommen worden. *6* intravenöse Injektion von 50 mg Chloralose. Zeitmarkierung 30 Min.

Die Aktivitätsschwankungen im Vollblut waren stets wesentlich größer als die in Serumproben; dabei war der Kurvenverlauf meist ähnlich, in einzelnen Fällen traten aber stärkere Abweichungen auf. Dies war an sich nicht unerwartet, da Hundeerythrozyten weniger Esterase enthalten, als

das Plasma (AMMON und VOSS[12]) und da Schwankungen der Mengenverhältnisse beider (bei Eindickung oder Hydrämie, die sich bei länger

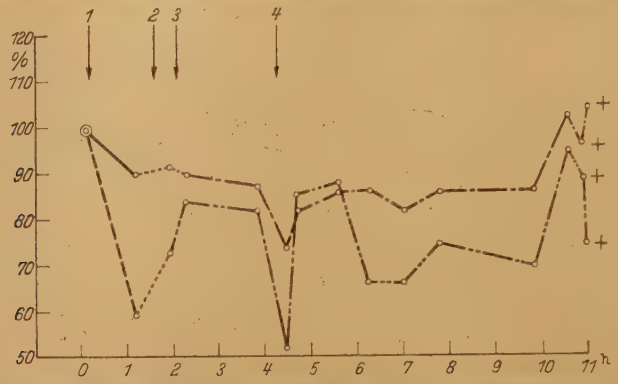


Abb. 6. —— venöses Serum, — — — venöses Vollblut, — · — arterielles Serum, — · — · — arterielles Vollblut von Hund 43. *1* subkutane Injektion von 5 ccm Pernocton; *2* Freilegung der Art. und Ven. brach. li.; *3* Freilegung der Art. carotis re.; *4* intravenöse Injektion von 50 mg Chloralose; + nach dem Tod entnommene Blutproben.

dauernden Tierversuchen kaum mit Sicherheit ganz ausschalten lassen) zu erheblichen Schwankungen der Gesamtesteraseaktivität bei Bestimmungen im Vollblut führen müssen. Die im Serum bestimmten Werte sind also wesentlich eindeutiger.

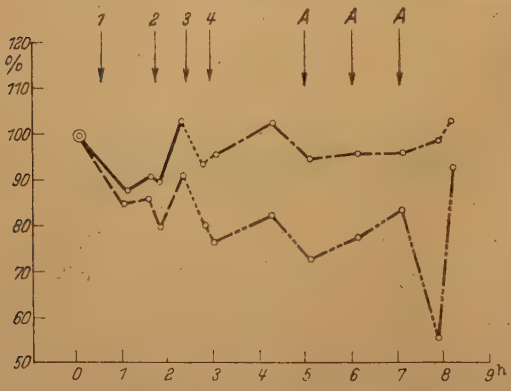


Abb. 7. —— venöses Serum, — — — venöses Vollblut, — · — arterielles Serum, — · — · — arterielles Vollblut von Hund 44; *1* intravenöse Injektion von 240 mg Chloralose; *2* intravenöse Injektion von 5 ccm Pernocton; *3* Freilegung der Art. und Ven. brach. li.; *4* Freilegung der Art. carotis re.; *A* Blutentnahmen von 150 ccm kurz vor den Entnahmen zur Esteraseauswertung.

Die Abb. 3 zeigt zwischen den Werten im Serum des venösen und des arteriellen Blutes geringe, zum Teil aber außerhalb des Bestimmungsfehlers liegende Differenzen. Der Kurvenverlauf stimmt im wesentlichen aber weitgehend überein. Hinsichtlich des Einflusses der operativen Eingriffe zur Freilegung von Gefäßen usw. zeigte sich, daß nennenswerte Aktivitätsschwankungen hierdurch nicht hervorgerufen wurden; die gelegentlich beobachteten außerhalb des Bestimmungsfehlers liegenden Senkungen waren außerordentlich gering. Bei wiederholten und in einigen Fällen bis zum Verblutungstod durchgeführten Blutentnahmen (vgl.

[12] AMMON, R. u. G. VOSS: Pflügers Arch. **235**, 393 (1935).

Abb. 3, 6, 7) kam es im Serum einmal (Abb. 3, Hund 41) zu einer schwachen Senkung, in den übrigen Fällen zu geringen Steigerungen der Aktivität in den letzten Proben. Auffallend war vor allem, daß große,

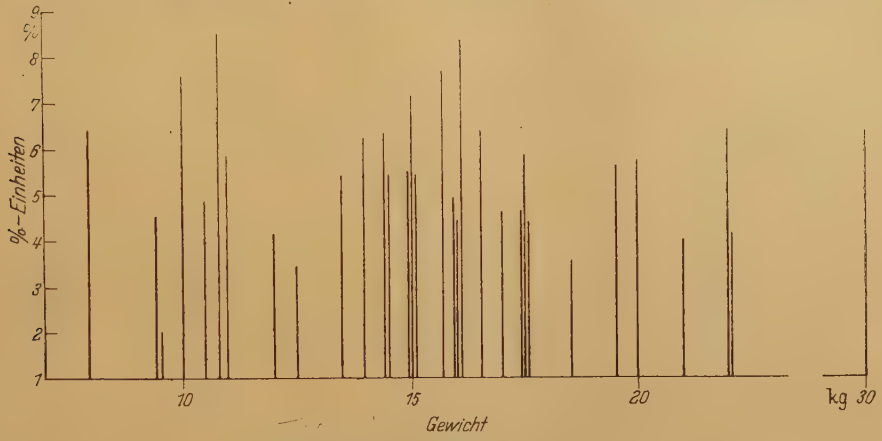


Abb. 8. Cholinesterase und Körpergewicht.

mehrmalige Blutentnahmen auch bei bereits stark absinkendem Blutdruck zunächst ohne nachweisbaren Einfluß auf die EA blieben (Abb. 7). Diese stieg erst an in den letzten Proben vor und unmittelbar nach dem

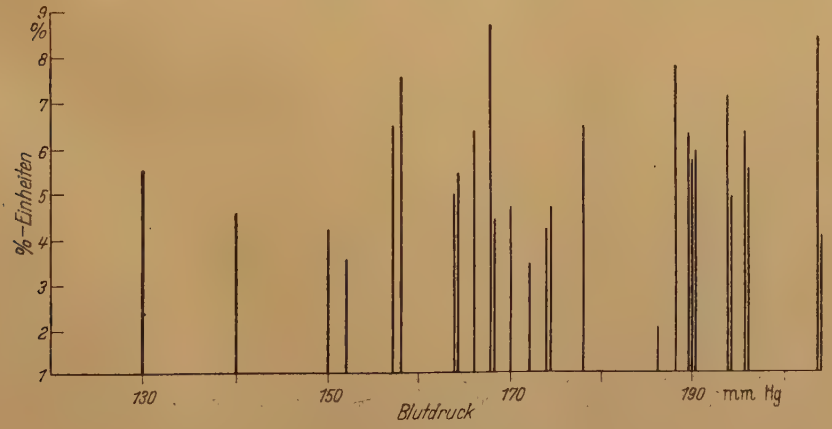


Abb. 9. Cholinesterase und Blutdruckhöhe.

Entblutungstod. Die Steigerungen waren, bezogen auf die ersten Auswertungen vor Beginn der Narkose, außerordentlich gering. Bezogen auf den Wert der ersten Bestimmungen nach der Narkose bzw. nach Narkose und Operation sowie auf den mittleren Kurvenverlauf betrugen sie höchstens 10—12%. Zur Veranschaulichung sind in Abb. 4 und 5 die Blut-

druckkurven der Versuchshunde, an welchen die EA-Auswertungen der Abb. 3 ausgeführt wurden, wiedergegeben. Die Marken über jeder Kurve geben die Zeiten an, zu denen die Blutproben zur EA-Bestimmung entnommen wurden.

Bei im ganzen 26 Versuchshunden wurden vergleichbare Werte (die der ersten Bestimmungen nach Narkose und Abschluß der operativen Vorbereitungen) zusammengestellt; es fanden sich Werte zwischen 2,0 und 8,6%-Einheiten; Beziehungen zwischen Esteraseaktivität und Körpergewicht, bzw. zwischen EA und Blutdruckhöhe waren nicht nachweisbar (vgl. Abb. 8 und 9).

Bei den männlichen, wie bei den weiblichen Versuchstieren war die Streuung etwa die gleiche. Da es sich um Hunde verschiedenen Alters, verschiedener Rasse und verschiedenen Ernährungszustandes handelte, ist dies durchaus verständlich. Es ist danach jedenfalls nicht möglich, durch die Bestimmung der EA im Blute einer großen Zahl von Normaltieren einen „Normal-Durchschnittswert" zu ermitteln, auf den man sich als Vergleichswert bei Bestimmungen nach experimentellen Schädigungen beziehen könnte. Individuelle Schwankungen dieser Art sind ja auch beim Menschen seit langem bekannt (vgl. GALEHR und PLATTNER[13], sowie VON VEREBÉLY [s. oben]). Man muß zur Feststellung von Esteraseschwankungen beim gleichen Tier, wie in den oben angeführten Versuchen, vor und nach der Schädigung die EA bestimmen, um vergleichbare Werte zu erhalten.

Besprechung der Ergebnisse.

Wie die nach Pernocton- und Chloralosegaben erhaltenen mäßigen Schwankungen der EA zu deuten sind, bleibt vorläufig unklar. Es war nicht beabsichtigt, der Frage der Beeinflussung der EA durch Narkotika systematisch nachzugehen. Wir verzichteten deshalb und vor allem im Hinblick auf die später auszuführenden Versuche in den meisten Fällen darauf, Blutproben unmittelbar vor und nach Pernocton- oder Chloralosegaben auszuwerten. Auffallend ist die bereits erwähnte Beobachtung einer stärkeren Senkung unmittelbar nach Chloralosegaben.

Auf Grund der Beobachtungen von THAUER und WEZLER[14] nach denen, entgegen älteren Vorstellungen, beide Narkotika — wie angenommen wird, in Anpassung an den geringen O_2-Verbrauch bei Hemmung der Oxydationsprozesse — zu erheblichen Umstellungen im Kreislauf führen, und auf Grund der von ZINNITZ[15] entwickelten Vorstellungen über die

[13] GALEHR, O. u. F. PLATTNER: Pflügers Arch. **218**, 488 (1928). — [14] THAUER, R. u. K. WEZLER: Arch. exper. Path. (D.) **200**, 84 (1942/43). — [15] ZINNITZ, F.: Arch. exper. Path. (D) **194**, 316 (1940). — ZINNITZ, F. u. E. RENTZ: Arch. exper. Path. (D.) **195**, 329 (1940).

Beziehungen zwischen Blutdruckänderungen und Schwankungen der EA im Blut, kann daran gedacht werden, daß der Esterase auch unter den von uns beobachteten Verhältnissen regulatorische Funktionen zukommen. Ebenso an die Mitteilung von Plattner und Hou[16], nach welcher unter anderem Chloralose steigernd auf die durch Vagusreizung oder durch Azetylcholin am isolierten Kaltblüterherzen auslösbaren Effekte wirkt, wird man sich in diesem Zusammenhang erinnern müssen. Ihre Beobachtung übrigens, daß Chloralose im Gegensatz zu Amylenhydrat die Aktivität von Herzesteraseextrakten in vitro nicht beeinflußt, können wir hinsichtlich der Serumesterase des Hundes bestätigen.

Bei den von uns angeführten Untersuchungen bestand, wie eben gesagt, nicht die Absicht, diesen Fragen besonders nachzugehen und etwa in die Erörterungen einzugreifen, welche sich an die Zinnitzschen Mitteilungen angeschlossen haben (Riechert und Frisch, Werle und Stüttgen, Pirolli[17]). Es handelte sich für uns ja vielmehr nur darum, die notwendige Grundlage zu schaffen, um die Frage zu klären, ob im Anschluß an bestimmte experimentelle Schädigungen Esteraseschwankungen im Blut auftreten, welche als Folgen dieser Schädigungen aufzufassen waren, und welche von Bedeutung beim Zustandekommen namentlich von Schockzuständen sein könnten. Zur Frage der kreislaufregulatorischen Bedeutung der EA im Blut sei hier nur darauf hingewiesen, daß — entgegen den Zinnitzschen Vorstellungen — mehrfach Steigerungen der EA bei gleichzeitigem Absinken des Blutdruckes in unseren Versuchen beobachtet wurden.

Daß Ahlmark und Kornerup (s. oben) im Gegensatz zu unseren Befunden keine Beeinflussung der EA durch Pernocton und Chloralose nachweisen konnten, ist wahrscheinlich auf die abweichende Methodik zurückzuführen. Sie wandten das biologische Bestimmungsverfahren an (Zusatz von Azetylcholinlösung zu Blutproben, Hitzeinaktivierung nach 6 Min. Einwirkungszeit, Auswertung am Meerschweinchendünndarmpräparat). Darauf, daß diese Auswertungsverfahren keine sicher reproduzierbaren und zuverlässigen Werte geben, ist — wie oben erwähnt — von verschiedenen Seiten mehrfach hingewiesen worden (vgl. unter anderem Faber, s. oben).

Die Ergebnisse von Verebély (s. oben), der über mehrere Tage Esterasebestimmungen im Vollblut bei Patienten nach eingreifenden Operationen und großen Blutverlusten ausführte und dabei Senkungen der EA fand, lassen sich mit den von uns an Hunden und innerhalb weniger Stunden

[16] Plattner, F. u. C. L. Hou: Pflügers Arch. **225**, 686 (1930). — [17] Riechert, W. u. W. Frisch: Arch. exper. Path. (D.) **200**, 235 (1942/43). — Pirolli, M.: Cuore **25**, 414 (1941). — Werle, E. u. G. Stüttgen: Klin. Wschr. **1942**, Nr 21, 821.

nach den Eingriffen ausgeführten Bestimmungen kaum vergleichen. Auch beim Menschen ist übrigens anzunehmen, daß die Ergebnisse der Auswertung im Vollblut schwer deutbar sind. Hier enthalten die Erythrozyten mehr Esterase als das Plasma (Ammon, s. oben). Die Pirollische Arbeit (s. oben), nach welcher nach Blutverlust im Tierversuch Steigerungen der EA im Serum beobachtet wurden, war uns im Original leider nicht zugänglich.

Bei den Aktivitätssteigerungen, welche in den meisten Fällen beim Ausbluten in den letzten Proben beobachtet wurden, bleibt selbstverständlich zunächst unsicher, ob es sich um eine Zunahme von Aktivatoren oder um eine Abnahme von Hemmungseffekten handelt.

Nach Abschluß der Untersuchungen wurde uns die Veröffentlichung von Sanz[18] über die von ihm nach dem Glickschen Prinzip entwickelte Mikromethode zur recht genauen Cholinesterasebestimmung bekannt. Die Genauigkeit unserer Bestimmung dürfte etwa die gleiche sein. Unser Verfahren hat den Nachteil, daß größere Flüssigkeitsmengen verwendet werden müssen, den Vorteil, daß Spezialapparaturen, welche zur Zeit nicht zu beschaffen gewesen wären, zur Durchführung nicht erforderlich sind.

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode zur Bestimmung der Aktivität der Cholinesterase im Blut und Serum beschrieben. Das Verfahren lehnt sich an die von Glick beschriebene titrimetrische Auswertung an der Glaselektrode an. Der Vorteil unserer eigenen Methode besteht darin, daß Spezialapparaturen nicht erforderlich sind.

Mit dieser Methode wird der Einfluß von Pernocton, Chloralose, vorbereitenden operativen Eingriffen und von mehrmaligen Blutentnahmen, welche zum Teil bis zum Kreislaufzusammenbruch durchgeführt wurden, auf die Aktivität der Cholinesterase im Serum und Vollblut bei Hunden bestimmt. Sowohl nach Chloralose-, wie nach Pernoctongaben kommt es im Serum und im Vollblut zu Senkungen der EA, gleichgültig, ob vor der Einwirkung des Narkotikums eine Basisnarkose durchgeführt worden war oder nicht. Unmittelbar nach Chloraloseinjektionen wurden vorübergehende, stärkere Senkungen beobachtet. Diese stärkeren Schwankungen glichen sich rasch, spätestens 2 Stunden nach der Injektion wieder aus. Nach operativen Eingriffen und Freilegung der V. und A. brachialis und der A. carotis kam es in den meisten Fällen zu schwachen Senkungen, die wesentlich unter denen nach Pernocton- oder Chloralosegaben zurückblieben. Bei wiederholten, größeren Blutentnahmen bis zur Entwicklung einer starken Kreislaufstörung kam es in 5 von 6 Versuchen zu deutlichen Steigerungen der EA (bis 29%). Diese Steigerungen traten erst spät, in den letzten Proben unmittelbar vor dem Tode des Versuchstieres auf. In

[18] Sanz, M.: Helvet. physiol. Acta **2**, 29 (1944).

allen anderen Proben waren die Esterasewerte — auch bei langdauernden Versuchen — stets niedriger als in denjenigen, welche zu Versuchsbeginn entnommen wurden. So lange es nicht zur stärkeren Kreislaufänderungen kam, waren größere Blutentnahmen ohne wesentlichen Einfluß auf die EA. Beim gleichen Hund schwankten die Werte der EA auch bei langer Versuchsdauer nur innerhalb sehr enger Grenzen. Zwischen verschiedenen Hunden finden sich aber erhebliche Differenzen. Abweichungen der EA von der Norm lassen sich also nur nachweisen, indem am *gleichen Tier* die Schwankungen nach Eintritt von Schädigungen verfolgt werden. Die im Vollblut bestimmten Esterasewerte sind schwerer deutbar, als die im Serum gefundenen, da bei jenen eine Reihe besonderer Faktoren, u. a. auch die Mengenverschiebungen zwischen Plasma und Zellen, von oft schwer übersehbarer Bedeutung sind.

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Greifswald
(Direktor: Prof. Dr. F. A. Hoppe-Seyler †.)

Untersuchungen über Cholinesterase im Blut nach experimentellen Schädigungen.

II. Mitteilung.

Das Verhalten der Cholinesterase in Vollblut und Serum bei experimenteller Erfrierung.

Von

Norbert Schümmelfeder.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. Oktober 1946.)

Als Beitrag zur Klärung der Pathophysiologie lokaler Erfrierungen und ihrer Auswirkungen auf den Gesamtorganismus wurde das Verhalten der Cholinesterase im Blut und Serum von Hunden bei und nach hochgradigen experimentellen Erfrierungen einzelner Extremitäten untersucht. Endzweck der Untersuchungen war, soweit möglich für eine kausale Therapie lokaler Erfrierungen am Menschen die theoretischen Grundlagen zu liefern.

Methodik.

Die Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität (EA) erfolgte entsprechend unserer I. Mitteilung nach dem modifizierten Glickschen Prinzip an der niederohmigen Glaselektrode. Die Genauigkeit der Methode, der Einfluß operativer Eingriffe und der Narkose wurden bereits an dieser Stelle mitgeteilt [1]. Bei 5 Hunden wurde das Verhalten der EA nach lokalen Erfrierungen im Vollblut allein, bei 1 Hund im Serum allein und bei 4 Tieren im Vollblut und Serum gleichzeitig verfolgt. Bestimmungen wurden bei allen Tieren im venösen Blut (bzw. Serum) der geschädigten Extremität, bei einem Teil der Versuche zusätzlich im venösen Blut (Serum) einer nicht geschädigten Gliedmaße oder im Vollblut und Serum aus der A. brach. durchgeführt. Das Gewicht der Tiere lag zwischen 16 und 24 kg. In Pernocton-Chloralosenarkose (vgl. [1]) wurde entsprechend dem von Lang, Schöttler, Schütte, Schwiegk und Westphal angewandten Verfahren [2] eine Hinterextremität mit Trockeneis-Aceton-Kältemischung rasch vollkommen eingefroren. Bei Kontrollversuchen zeigte sich, daß die Temperatur unter der Haut dabei bis -40^0 C, am Femur bis $+20^0$ absank (Messung mit Thermoelementen). Bis zur Tiefe von etwa $1^1/_2$ cm waren Haut und Muskulatur hart eingefroren. An den einzelnen Tieren wurde nur ein Versuch durchgeführt, während noch laufender Narkose töteten wir die Tiere nach Abschluß der Versuche durch eine intravenöse Chloroforminjektion.

[1] Schümmelfeder, N.: (I. Mitt.) Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 454 (1947). — [2] Lang, K., H. W. A. Schöttler, E. Schütte, H. Schwiegk u. U. Westphal: Klin. Wschr. **1943 I**, 444.

Bei den Hunden wurde eine paraffinierte T-Kanüle aus Glas in die Vena femoralis der zum Versuch bestimmten Hinterextremität eingebunden. Bei Versuchen, bei denen Kontrollbestimmungen der EA im Blut der Vena femoralis der nicht eingefrorenen Gliedmaße gemacht wurden, war eine T-Kanüle aus Glas auch in die Vene dieser Extremität eingebunden worden. Für Auswertungen im arteriellen Blut wurde in den zentralen Stumpf der A. brachialis links eine Metallkanüle eingelegt. Die Tiere, an denen Bestimmungen nur im Vollblut durchgeführt wurden, waren zur Verhinderung der Blutgerinnung voll heparinisiert (Vetren „Promonta"). In Vorversuchen war festgestellt worden, daß Vetren keinen Einfluß auf die Aktivität der Cholinesterase hatte. Für die Auswertungen wurden jedesmal etwa 20 ccm Blut entnommen, die ersten Kubikzentimeter Blut wurden dabei verworfen.

Der Blutdruck wurde in jedem Versuch blutig an der A. carotis gemessen und die Blutdruckkurve aufgezeichnet.

Versuchsergebnisse.

Die Versuchsergebnisse werden durch die folgenden Abbildungen veranschaulicht. Als 100% wurde der letzte Wert vor Beginn des Einfrierens eingesetzt (vgl. [1]).

Aus den in unserer früheren Arbeit dargelegten Gründen sind auch hier die Schwankungen im Vollblut (Abb. 1a, 1b, 2a, 2b) unübersichtlich:

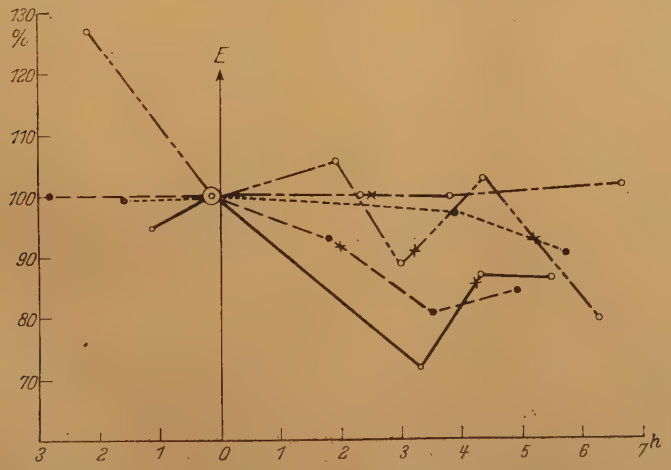


Abb. 1a. —— Hund 20; — — Hund 21; —·— Hund 22; ----- Hund 36; —·—·— Hund 27; —×— Beginn des Auftauens; *E* Beginn des Einfrierens. Venöses Vollblut der geschädigten Extremität.

in 4 Fällen Senkungen (Hund 20, 21, 36, 40), in einem Fall Steigerung (Hund 39) und in einem weiteren Fall schwankende Werte (Hund 27). Daß es bei den Versuchen zu Änderungen der Blutkonzentration kam, auf die diese unübersichtlichen Ergebnisse zum Teil zurückgeführt werden können, wurde in 2 Fällen, in welchen Hämatokritwerte nach Boenninger[3] während der Versuchsdauer bestimmt wurden, festgestellt: sowohl

[3] Boenninger: Zit. nach Müller, Seifert, Krebs: Taschenbuch der medizinisch-klinischen Diagnostik, S. 218. München 1944.

im venösen Blut der geschädigten, wie im venösen und arteriellen Blut nicht geschädigter Extremitäten kam es, nach anfänglich geringen Schwankungen der Werte nach beiden Richtungen, während des Auftauens zu Anstiegen des Erythrocytenanteils, die besonders im venösen Blut aus der geschädigten Seite deutlich waren. Da die Erythrocyten, wie bekannt[4], beim Hund weniger Esterase enthalten als das Serum, dürften die vorwiegend beobachteten Senkungen der EA auf diese Erythrocytenzunahme zurückzuführen sein.

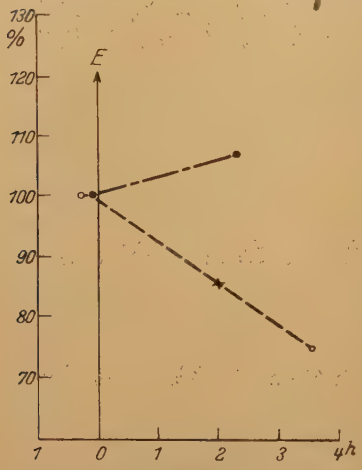


Abb. 1b. Arterielles Vollblut einer nicht geschädigten Extremität.

Im Serum (Abb. 1c, 2c, 2d, 3) fanden wir regelmäßig Steigerungen der EA, die schon während des Einfrierens einsetzten, nach dem Auftauen (mit einer Ausnahme — Hund 34, Abb. 3 —, bei welcher die Werte im venösen Serum der geschädigten Gliedmaße auf gleicher Höhe blieben) noch weiter und meist erheblich zunahmen. Die Steigerungen erreichten die größte Höhe regelmäßig im Serum des aus der geschädigten Extremität abfließenden Blutes, sie lagen hier zwischen 16 und 41%, im Serum des venösen Blutes der ungeschädigten Seite zwischen

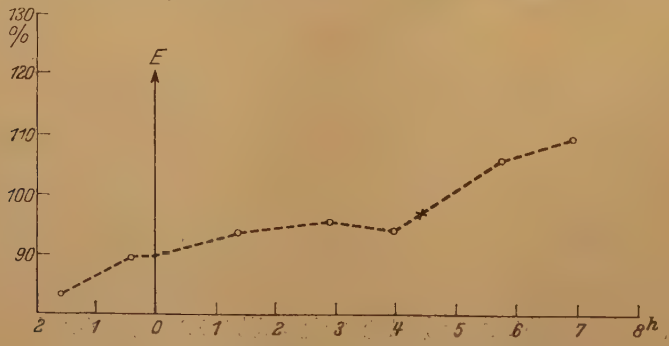


Abb. 1c. Venöses Serum der geschädigten Extremität.

19 und 25%, im arteriellen Blutserum zwischen 5 und 16%. Ausnahmsweise ist bei Hund 34 der Esterasewert in dem Serum des nach dem Auftauen entnommenen venösen Blutes aus der ungeschädigten Extremität um 5% höher, als im Serum der geschädigten Gliedmaße.

Bei keinem dieser Versuche kam es zu stärkeren Blutdrucksenkungen oder gar zu Kollapserscheinungen; bei 7 von 10 Hunden zu mehr oder

[4] Ammon, R. u. G. Voss: Pflügers Arch. **235**, 393 (1935).

weniger starkem Absinken der Rectaltemperatur während des Einfrierens (0,5—7,4°), bei 3 Tieren war die Körpertemperatur unverändert. In

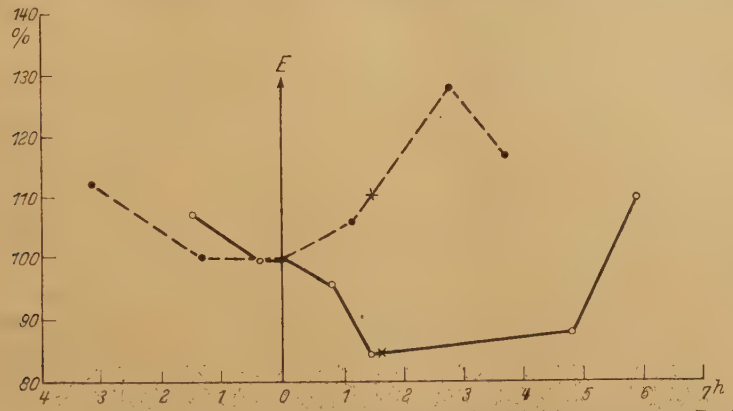


Abb. 2a. –– Hund 39; —— Hund 40; *E* Beginn des Einfrierens; —x— Beginn des Auftauens. Venöses Vollblut der geschädigten Extremität.

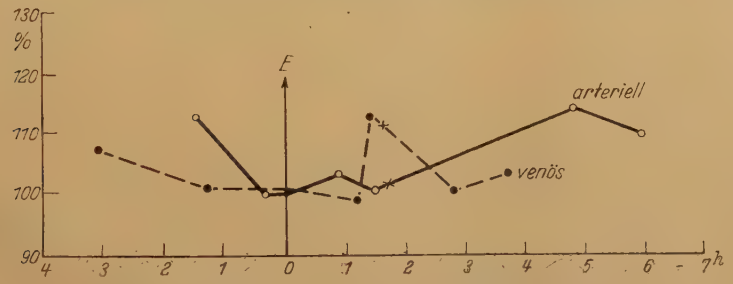


Abb. 2b. Vollblut einer nicht geschädigten Extremität.

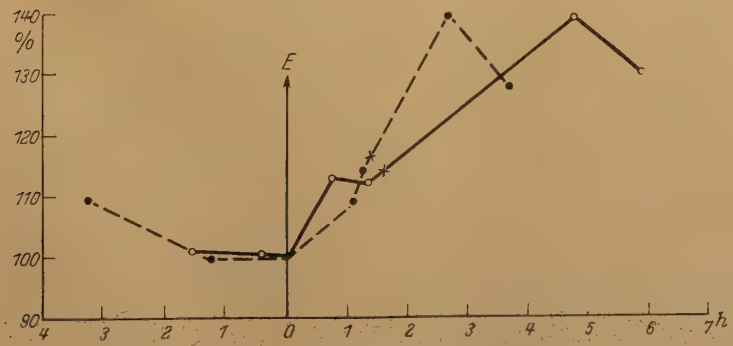


Abb. 2c. Venöses Serum der geschädigten Extremität.

2 Fällen stieg die Temperatur nach Auftauen auf den Ausgangswert, in 5 Fällen sank sie auch nach dem Auftauen weiter ab. Bei mehreren Hunden wurden nach Beginn des Einfrierens Blutdrucksteigerungen bis zu 20 mm Hg

beobachtet. Bei diesen sank der Blutdruck nach dem Auftauen regelmäßig wieder auf die Anfangswerte ab.

In einem Fall, der in den Abbildungen nicht mit angeführt worden ist, kam es innerhalb von weniger als 2 Stunden nach Beginn des Einfrierens

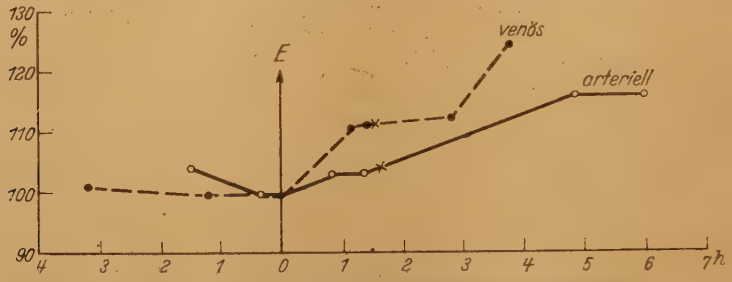


Abb. 2 d. Serum einer nicht geschädigten Extremität.

zum starken Absinken der Rectaltemperatur bis auf 28° und zum Tod. Der Blutdruck sank hierbei von 140 auf 40 mm Hg. Die EA stieg im Vollblut und im Serum des venösen Blutes der geschädigten Gliedmaße

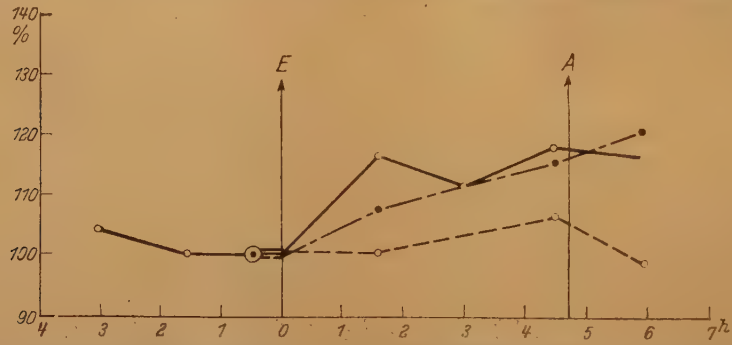


Abb. 3. Hund 34. —— venöses Serum der geschädigten Extremität; — — venöses Serum einer nicht geschädigten Extremität; — — — arterielles Serum einer nicht geschädigten Extremität; *E* Beginn des Einfrierens; *A* Beginn des Auftauens.

nach der ersten Stunde etwas an, um 10 bzw. 5%, fiel dann bis zum Tod auf den Anfangswert im Vollblut, im Serum auf 5% unter diesen Wert ab.

Besprechung der Ergebnisse.

An Angaben über Änderungen der EA im Blut bei lokalen Erfrierungen ist uns aus der Literatur nichts bekannt. Änderungen der EA bei Gesamtauskühlungen wurden von VILLASANTE[5] an Kaninchen beobachtet. In kalten Bädern von 19° fand er beim Absinken der Körpertemperatur auf rectal gemessene Werte zwischen 29 und 32° Senkungen der Esterasewerte im Vollblut, geringere auch im Plasma. Die Befunde lassen sich nicht

[5] VILLASANTE, J. G.: Rev. Clin. españ. 3, 526 (1941).

ohne weiteres mit den von uns an Hunden nach lokalen Erfrierungen erhaltenen vergleichen. Von Interesse ist die Mitteilung von MAHAL[6], nach welcher die EA im Serum von Tieren sich nach Einfrieren in vitro nicht ändert. Dementsprechend fanden wir in normalen Serumproben von Hunden keine Änderungen auch nach mehrstündiger Aufbewahrung bei $+4^0$ (vgl. auch AMMON[7]). Die von uns bei den Erfrierungsversuchen beobachteten Steigerungen der EA sind also jedenfalls nicht als unmittelbare Kältewirkung am Ferment anzusehen.

Hinsichtlich dieser Steigerungen ergaben sich verschiedene Deutungsmöglichkeiten: Man konnte daran denken, daß es sich um das Zeichen einer Ausschwemmung von Gewebsfermenten aus den geschädigten Organen handele, wie es für proteolytische Fermente von PFEIFFER[8] nachgewiesen wurde, andererseits auch darum, daß aus den geschädigten Geweben Aktivatoren der Esterase oder Stoffe, welche Inaktivatoren hemmen, vermehrt an das Blut abgegeben wurden. Über Aktivatoren und Inaktivatoren finden sich bei NACHMANSOHN[9], MASSART und DUFAIT[10], AMMON[11] und FROMMEL mit Mitarb.[12] Angaben. Die Steigerungen der EA würden so betrachtet als Symptom der Gewebsschädigung aufzufassen sein. Daneben muß besonders daran gedacht werden, daß Änderungen der vegetativ-nervösen Regulationslage zu derartigen Steigerungen der EA führen können. Versuche, insbesondere eine kreislaufregulatorische Funktion der Blutcholinesterase nachzuweisen, sind von ZINNITZ[13], PIROLLI u. a.[14] ausgeführt worden. Nach der Auffassung der einen Untersucher kommt es nach Zufuhr von blutdrucksenkenden Stoffen (Acetylcholin u. a.) zu Hemmungen der EA und damit zum Abfall des Blutdrucks. Nach Angaben der anderen Gruppe entstehen nach Blutentnahmen Steigerungen, nach Zufuhr von blutdrucksteigernden Stoffen (Adrenalin u. a.) Senkungen der EA im Serum, welche im Sinne einer Gegenregulation aufgefaßt werden. Bei den mitgeteilten Erfrierungsversuchen könnte man also daran denken, daß bei zunehmender parasympathischer Reizung, die schließlich, wenn es

---

[6] MAHAL, H. S.: Indian J. med. Res. **25**, 703 (1938). — [7] AMMON, R.: In E. BAMANN u. K. MYRBÄCKS Methoden der Fermentforschung, Bd. 2, S. 1588. Leipzig 1941. — [8] PFEIFFER, H.: Krkh.forsch. **1**, 407 (1925). — [9] NACHMANSOHN, D.: Nature (Brit.) **145**, 513 (1940). — NACHMANSOHN, D. u. E. LEDERER: Bull. Soc. Chim. biol. (Fr.) **21**, 797 (1939). — [10] MASSART, H. u. R. DUFAIT: Verh. Kon. Vlaamsche Acad. Wetensch., Letteren Schoone Kunsten Belgie, Kl. Wetensch. **3**, Nr 2, 3 (1941). — Bull. Soc. Chim. biol. (Fr.) **21**, 1039 (1940). — Enzymologia (Nd.) **6**, 282 (1939). — [11] AMMON, R.: Erg. Enzymforsch. **9**, 35 (1943). — [12] FROMMEL, E., A. D. HERSCHBERG u. J. PIQUET: Helvet. physiol. Acta **1**, 229 (1943). — FROMMEL, E., E. ARON, A. D. HERSCHBERG, J. PIQUET u. A. GOLDFÉDER: Helvet. physiol. Acta **2**, 111 (1944). — ARON, E., A. D. HERSCHBERG u. E. FROMMEL: Helvet. physiol. Acta **2**, 495 (1944). — HERSCHBERG, A. D., E. FROMMEL u. J. PIQUET: Helvet. physiol. Acta **2**, 507 (1944). — [13] ZINNITZ, F.: Arch. exper. Path. (D.) **194**, 316 (1940). — ZINNITZ, F. u. E. RENTZ: Arch. exper. Path. (D.) **195**, 329 (1940). — [14] PIROLLI, M.: Cuore **25**, 414 (1941). — Boll. Soc. ital. Biol. sper. **17**, 437 (1942).

zu starker Gesamtunterkühlung kommt, zu Blutdrucksenkungen führen würde, gegenregulatorisch eine Steigerung der EA hervorgerufen wird, die den Blutdruckabfall zunächst verhindert. Schließlich muß natürlich auch daran gedacht werden, daß möglicherweise Cholinesterase aus Bildungsstätten, z. B. aus der Leber (Faber[15]), im Sinne einer Gegenregulation vermehrt an das Blut abgegeben werden kann.

Zur Klärung dieser Fragen sind weitere Versuche erforderlich. Die Beobachtung, daß die EA-Anstiege im Serum bei unseren Versuchen am ausgeprägtesten im venösen Blutserum der geschädigten Extremität auftraten, könnten für die Vorstellung, nach der es sich um vermehrte Fermentabgabe aus geschädigten Geweben handelt, sprechen. Die allerdings vereinzelte Beobachtung, nach welcher bei tödlichem Blutdruckabfall nach stärkerer Allgemeinunterkühlung der EA-Anstieg ganz gering blieb und vor dem Tod schon zurückging, würde eher zu der Vorstellung passen, daß die Änderung der EA im Sinne eines — hier gestörten — gegenregulatorischen Vorganges aufzufassen ist.

Zusammenfassung.

1. Das Verhalten der Cholinesterase in Vollblut und Serum bei und nach hochgradigen lokalen Erfrierungen wird an Hunden geprüft.

2. Die im Vollblut erhaltenen Werte sind schwer deutbar; meist finden sich hier Senkungen der EA während des Einfrierens und beim Auftauen im venösen Blut der geschädigten Extremität. Wahrscheinlich sind diese Senkungen bedingt durch Änderungen der Blutzusammensetzung. Sie verdecken die Änderungen der EA im Serum.

3. Im Serum kam es bei 4 von 5 Hunden zu Steigerungen nach dem Einfrieren und während des Auftauens. Die EA-Werte lagen im venösen Blutserum aus der geschädigten Extremität 16—41% über dem Ausgangswert. Aber auch im arteriellen (5—16%) sowie venösen Blutserum (19 bis 25%) eines ungeschädigten Gliedmaßes kam es zu Steigerungen. Nennenswerte Änderungen des Blutdruckes in zeitlicher Beziehung zu den beobachteten Esteraseschwankungen konnten nicht festgestellt werden.

4. Nur bei dem 5. Versuchstier — während des Versuches kam es zur stärkeren Gesamtunterkühlung und zum tödlichen Blutdruckabfall — blieb die Steigerung der EA fast ganz aus und es kam unmittelbar vor dem Tod sogar zu einer schwachen Senkung.

5. Die Frage, wie die beobachteten Steigerungen im Serum zu deuten sind und namentlich, ob es sich um vermehrte Abgabe des Fermentes aus geschädigtem Gewebe oder aber um eine stärkere Aktivierung bzw. eine Mehrabgabe des Fermentes aus Bildungsorten handelt, welche im Sinne einer kreislaufregulatorischen Funktion der Esterase verstanden werden könnten, wird besonders erörtert.

[15] Faber, M.: Diss. Kopenhagen 1941. — Acta med. scand. (Schwd.) **114**, 72 (1943).

Aus der II. Medizinischen Universitätsklinik der Charité in Berlin.
(Direktor: Professor Dr. G. v. Bergmann.)

Experimentelle Untersuchungen über die Kreislaufveränderungen beim Myokardinfarkt und ihre Bedeutung für die Therapie *.

Von

Gustav Schimert jr.

Mit 9 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. Oktober 1946.)

Angeregt durch die Forschungen von Jarisch und seinen Mitarbeitern über die von Herzen ausgehenden reflektorischen Kreislaufveränderungen durch die Mistel und Veratrinwirkung wurde auf Grund eigener Untersuchungen über die klinische Bedeutung des Bezold-Effektes gemeinsam mit S. Dietrich die Vermutung geäußert, daß der Kollaps beim Myokardinfarkt nicht als Folge eines Herz- oder peripheren Kreislaufversagens, sondern durch Reizung sensibler Endigungen im geschädigten Herzmuskel entsteht, demnach als ein Entlastungsreflex zum Schutze des bedrohten Herzens anzusehen ist; dabei wurde angenommen, daß durch den Sauerstoffmangel im Myokard ähnlich wie durch das Veratrin die sensiblen Endigungen gereizt werden und über den Vagus die reflektorische Einschränkung des Kreislaufes erfolgt. Diese Vermutung, die von zahlreichen klinischen Beobachtungen gestützt wird, aus denen hervorgeht, daß beim Menschen im Kollaps beim Myokardinfarkt der Kreislauf eingeschränkt ist (Hochrein, Fischberg, Hitzig und King, Haus, Tietze und Falk, Dietrich und Schimert), bedurfte jedoch noch einer experimentellen Klärung, deren Versuch in vorliegender Arbeit gemacht werden soll.

Die Fragestellung dieser Arbeit lautet:

1. Welche Veränderungen treten im Kreislauf nach einem Coronarverschluß ein?

2. Sind diese Veränderungen vasomotorischer Natur oder auf eine Änderung der Leistungsfähigkeit des Herzens selbst zurückzuführen?

3. Handelt es sich bei diesen Kreislaufveränderungen wenigstens zum Teil um Erscheinungen, die durch den Jarisch-Bezold-Effekt zu erklären sind und sind diese Vorgänge als Schutzmaßnahmen anzusehen, die eine Überlastung des bedrohten Herzens verhindern sollen?

* Auf die weitere klinische Bedeutung dieser Ergebnisse wird in einer späteren Veröffentlichung näher eingegangen.

4. Welche Bedeutung haben die Kreislaufreaktionen für die Therapie?
5. Durch welche Mittel werden die als günstig erkannten Kreislaufreaktionen unterstützt? Durch welche Maßnahmen verhindert?

I. Die Kreislaufreaktionen nach dem Coronarverschluß und ihre Beeinflussung durch Aus- und Einschaltung der Vagi.

Methodik.

Die Versuche werden an Hunden und Katzen in Chloralosenarkose durchgeführt. Zur Vermeidung von Störungen durch Veränderung der Atmung wurden die Tiere künstlich beatmet. Zur Registrierung gelangte bei den Katzen der Blutdruck in der einen Femoralarterie und die Durchblutungsgröße der A. iliaca communis oder der anderen Femoralarterie. Diese beiden Arterien geben ein Bild von der peripheren Durchblutungsgröße. Bei Katzen konnte der Venendruck im Beginn der Versuche nicht optisch mitregistriert werden, wurde aber zur Kontrolle auf einer Rußtrommel aufgezeichnet. Bei den Hunden wurde der Blutdruck in der A. femoralis und der Vorhofdruck in der rechten V. jugularis durch eine vorgeschobene Kanüle aufgezeichnet. Weiterhin wurde mit der Reinschen Stromuhr die Durchströmung der A. coronaria dextra sowie teils die Durchströmung der V. cava inferior und teils die Durchblutung der A. pulmonalis registriert. Die Durchblutungsgröße der letzten beiden genannten Gefäße erlaubt die zum Herzen strömende Blutmenge bzw. die vom rechten Ventrikel über den kleinen Kreislauf laufende Blutmenge relativ zu bestimmen. Es ist daher ein Rückschluß auf das Minutenvolumen möglich.

Die Myokardinfarkte wurden durch Unterbindung des absteigenden Astes der linken Kranzarterie ausgelöst. Die Unterbindung selbst erfolgte, soweit sie in den Kurven unmittelbar dargestellt ist, bei wiederverschlossenem Thorax durch eine während der Operation zur Anbringung der Thermoelemente tangential an das Herz angelegte Schlinge, um die entsprechende Arterie. Durch Zuziehung der beiden durch die Thoraxwände hindurchgezogenen Enden der Schlinge konnte bei einem Teile der Versuchstiere ohne wesentliche Veränderung der intrathorakalen Verhältnisse der Coronarverschluß erzeugt werden, währenddem gleichzeitig die Veränderungen des Kreislaufes durch die Thermoelemente ungestört registriert werden konnten. Bei einem Teil der Katzen wurde statt der Coronarligatur die von Rubino beschriebene Alkoholinjektion in den Herzmuskel zur Erzeugung von Nekrosen gewählt. In diesen Fällen wurde der Thorax an einer kleinen Stelle durch Resektion eines Rippenstückes offengelassen und die Injektion unter Kontrolle des Auges durchgeführt. Um Einblick in die Vorgänge in verschieden innervierten Gefäßgebieten zu erhalten, wurde in einzelnen Versuchen neben der Cava inferior oder der Femoralarterie die A. mesenterica inferior oder superior registriert. Die Aus- und Einschaltung der Vagi erfolgte durch Kühlung bzw. Erwärmung.

Versuche.

Die Abb. 1 zeigt das Verhalten des Blutdruckes und der peripheren Durchblutung bei einer Katze im Augenblick der Unterbindung der linken Kranzarterie sowie beim nachfolgenden Aus- und Einschalten der Vagi. Wir sehen, daß vor dem Coronarverschluß die Einschaltung der vorher gekühlten und damit ausgeschalteten Vagi eine geringe Blutdrucksteigerung unter gleichzeitiger angedeuteter Senkung der peripheren Durchblutung (Arteria iliaca) verursacht. Bei der darauffolgenden Unterbindung der linken Kranzarterie erfolgt während einer stark arrhythmischen Phase

Abb. 1. Katze in Chloralosenarkose: Registrierung der peripheren Durchblutung (A. iliaca d.) bei Unterbindung der A. coronaria s. Vagus durch Kühlung und Erwärmung aus- und eingeschaltet.

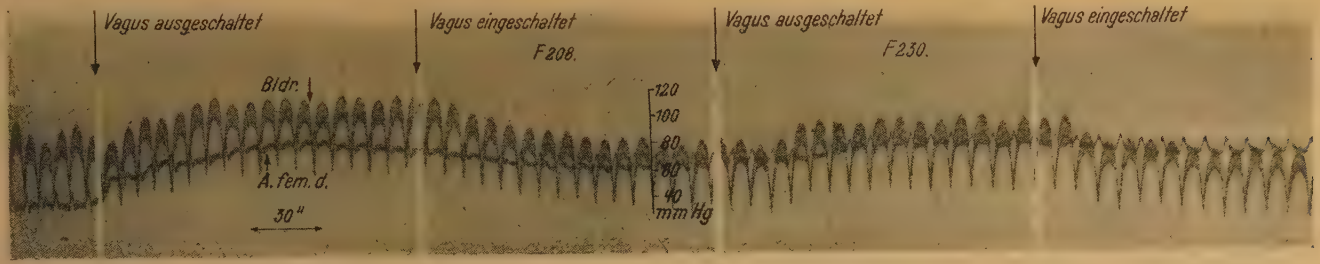


Abb. 2. Katze in Chloralosenarkose: Registrierung der A. femoralis d. und des Blutdruckes nach vorheriger Alkoholnekrose des Herzmuskels. Aus- und Einschaltung der Vagi.

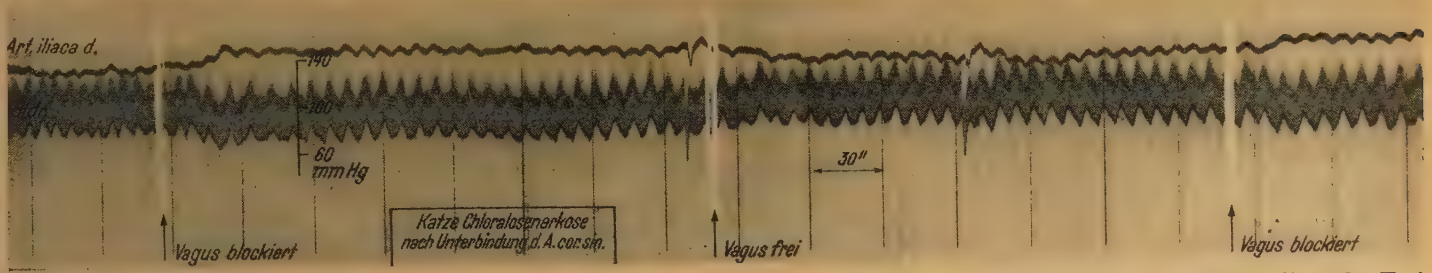


Abb. 3. Katze in Chloralosenarkose: Registrierung der peripheren Durchblutung (A. iliaca d.) und des Blutdruckes. Aus- und Einschaltung der Vagi. Vorher Unterbindung der A. coronaria s., auf die nicht eine Senkung, sondern Steigerung des Blutdruckes mit Abnahme der peripheren Durchblutung erfolgte.

das rapide Absinken des Blutdruckes bei gleichzeitiger starker Abnahme der peripheren Durchblutung. Nach etwa 30 Sek. erhöht sich der Blutdruck wieder etwas nach Beendigung der arrhythmischen Phase, bleibt aber auch weiter etwa 40 mm unter dem Ausgangswert. Die periphere Durchblutung ist ebenfalls beträchtlich, um etwa 50%, gesenkt. Die jetzt vorgenommene Ausschaltung des Vagus führt zu einem sofortigen Anstieg der peripheren Durchblutung, dem langsam auch eine geringe Zunahme des Blutdruckes folgt. Wird jetzt der Vagus wieder eingeschaltet, so tritt unter gleichzeitiger Senkung des Blutdruckes eine sehr starke Abnahme der peripheren Durchblutung ein, die sich etwa bis zum Ausgangswert nach der Infarktbildung senkt. Dieser Vorgang läßt sich mehrmals wiederholen, es erfolgt jedesmal nach Ausschaltung der Vagi eine Zunahme der peripheren Durchblutung und des Blutdruckes, die auf eine Steigerung des Minutenvolumens schließen läßt, während in der Phase der eingeschalteten Vagi eine Abnahme des Zeitvolumens angenommen werden darf. Bei diesem Versuch war der zur Kontrolle beobachtete Vorhofdruck (auf der Kurve nicht dargestellt) nur in der Zeit der arrhythmischen Phase leicht gesteigert, er blieb sonst unverändert. Der hier gezeigte Befund spricht für die Entstehung im Vagus geleiteter depressorischer Impulse nach dem Coronarverschluß, wie wir es in ähnlicher Weise in dem durch das Veratrin ausgelösten Bezold-Effekt sehen. Damit kann angenommen werden, daß beim Herzinfarkt eine reflektorische Senkung des Blutdruckes und, was besonders wesentlich ist, eine reflektorische Senkung der peripheren nicht lebenswichtigen Blutversorgung besteht. Diese Veränderung der peripheren Durchblutung ist in manchen Fällen noch viel eindrucksvoller als das Verhalten des Blutdruckes. Das Ausmaß der Blutdrucksenkung scheint individuell große Unterschiede zu zeigen, wie dies aus Abb. 2 ersichtlich wird. Hier ist der Blutdruckeffekt wesentlich deutlicher als die Veränderung der Durchblutungsgröße.

Im Versuch, der in Abb. 2 gezeigt wird, wurde durch hochprozentigen Alkohol eine umschriebene Nekrose in der Muskulatur des linken Ventrikels gesetzt, die zu einem Blutdruckabfall von etwa 40 mm Hg führte. Außerdem trat auch hier eine deutliche Senkung der peripheren Durchblutung ein. Dieser Effekt nach der Alkoholinjektion konnte durch die Ausschaltung der Vagi wieder rückgängig gemacht werden.

Dieses Verhalten des Blutdruckes und der peripheren Durchblutung ist jedoch nicht obligatorisch. Sie trat nur bei 8 der 14 untersuchten Katzen ein. Öfters blieben nach Unterbindung eines größeren Coronarastes die Kreislaufverhältnisse unverändert. Bei diesen Versuchen könnte allerdings angenommen werden, daß infolge einer guten Kollateralversorgung keine ausreichende Schädigung des Herzmuskels eingetreten ist. Bei 2 von 14 untersuchten Katzen war sogar eine Steigerung des Blutdruckes nach der Coronarligatur zu beobachten. Aber interessanterweise

war auch in diesen Fällen eine leichte Abnahme der peripheren Durchblutungsgröße festzustellen, zum Beweis dafür, daß die Veränderungen der peripheren Durchblutung nicht blutdrucksynchron laufen, bzw. nicht blutdruckabhängig sind, wie man annehmen würde.

Abb. 3 zeigt das Verhalten eines Versuchstieres, das nach Unterbindung des linken Coronargefäßes nur eine geringe Senkung der peripheren Durchblutung aufwies, ohne daß der Blutdruck verändert wurde. Hier trat nach Blockierung der Vagi unter gleichzeitigem Anstieg der peripheren Durchblutung im Gegensatz zu den erstgeschilderten Versuchen eine geringe, aber deutliche Senkung des Blutdruckes ein, die bei Einschaltung der Vagi unter Abnahme der peripheren Durchblutung wieder verschwindet. Dieser Befund wäre vielleicht im Sinne eines pressorischen Effektes nach McDOWALL zu bewerten. Die Senkung der peripheren Durchblutung nach Einschaltung der Vagi dürfte auch hier als ein Beweis für die nutritive Bedeutung der Vagi für das Herz angesehen werden.

Es muß hier noch ergänzt werden, daß gelegentlich bei der Anlegung einer Coronarligatur auch erhebliche Senkungen des Blutdruckes zu verzeichnen waren, ohne daß eine nennenswerte Änderung der peripheren Durchblutungsgröße stattfand.

Wir sehen aus der verschiedenen Reaktionsform, daß in bezug auf die reflektorischen Kreislaufveränderungen nach dem Coronarverschluß große individuelle Unterschiede bestehen, die teils auf die vegetative Reaktionslage, teilweise aber auch auf die verschiedene Ausbildung des Gefäßsystems zurückzuführen sind, die trotz Anlegung der Ligatur in möglichst gleicher Höhe nach Abgang des Gefäßes anämische Gebiete von sehr verschiedener Größe entstehen lassen.

Die nächsten Versuche wurden an Hunden durchgeführt, bei denen auch eine Beobachtung des übrigen Coronarkreislaufes im Augenblick der Coronarunterbindung möglich war.

Es ist hier besonders zu betonen, daß die Versuche an Hunden methodisch wesentlich größere Schwierigkeiten bereitet haben als die bei Katzen, da das Hundeherz gegenüber einer Coronarunterbindung sehr empfindlich ist und sehr oft zum letalen Flimmern kommt, wodurch schon allein etwa 50% der Versuche ausfallen. Dies gilt besonders für die Versuche, bei denen das Herz schon vorgeschädigt ist durch die Manipulation bei Anlegung des Thermoelementes am anderen Coronargefäß und an der V. cava inferior. Weitere 15—20% der Tiere bekamen schon während dieser Operation eine sehr erhebliche Blutdrucksenkung, die, wie Vagusausschaltungen zeigen, schon auf dem Eintritt des BEZOLD-Effektes nach Verletzung des Herzmuskels beruht. Hier war natürlich eine weitere Senkung durch Coronarligatur nicht zu erwarten. Nach Ansicht v. JARISCHS ist der BEZOLD-Effekt bei sehr niedrigen Drucken nicht mehr auslösbar. Es waren also nur etwa ein Drittel der Versuche einwandfrei verwertbar. Abgesehen von diesen Schwierigkeiten stellt sich der BEZOLD-Effekt bei Hunden nicht so eindrucksvoll dar wie bei Katzen, die Blutdrucksenkungen, und damit auch die Gefäßreaktionen sind wesentlich geringer. Von insgesamt 42 Hunden waren auf diese Weise nur 15 Infarktversuche einwandfrei zu verwerten.

Abb. 4 zeigt das Verhalten der Durchblutung des rechten Coronargefäßes und der Vena cava inferior im Augenblick der Unterbindung des linken Coronargefäßes. Der hier mitregistrierte Druck im rechten Vorhof gestattet auch eine Änderung der Leistungsfähigkeit des Herzens festzustellen. Hier kommt es kurz nach dem Coronarverschluß zu einer sehr erheblichen Senkung der Cavadurchblutung, die bei der unempfindlichen Registrierung so großer Gefäße sehr hoch zu bewerten ist. Gleichzeitig ist ein geringer Anstieg der Coronardurchblutung zu verzeichnen, der aber bei gleichzeitiger Abnahme des Blutangebotes an das Herz und Abnahme des Blutdruckes wesentlich höher bewertet werden muß, da normalerweise die Coronardurchblutung bei unveränderter Frequenz mit Blutdruck- und Minutenvolumen gleichsinnig abnehmen müßte. Das unveränderte Verhalten des Vorhofdruckes beweist demnach im Sinne der Forderung JARISCHS die rein vasomotorische Entstehung dieser Veränderung, die nicht auf eine Insuffizienz des Herzens zurückzuführen ist. Weiterhin ist anzunehmen, daß die dem Herzen angebotene Blutmenge und damit gleichzeitig auch die zirkulierende Blutmenge vermindert ist.

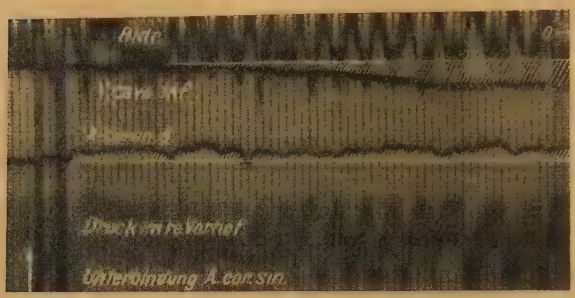


Abb. 4. Hund in Chloralosenarkose: Durchblutung der V. cava inferior (relatives Minutenvolumen), Durchblutung der A. coronaria d., Blutdruck in der A. femoralis im Augenblick der Unterbindung des absteigenden Astes der A. coronaria s. Senkung von Blutdruck und Minutenvolumen. Anstieg der Coronardurchblutung. Vorhofdruck bleibt unverändert.

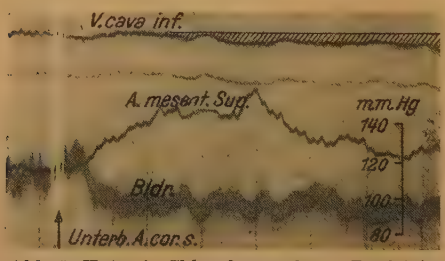


Abb. 5. Katze in Chloralosenarkose: Registrierung der Durchblutung der V. cava inferior, der A. mesent. sup. und des Blutdruckes im Augenblick der Unterbindung der A. coronaria s. Während das Blutangebot an das Herz abnimmt, zeigt die vorübergehende Zunahme der Durchblutung der A. mesent. eine Füllung der abdominellen Blutspeicher an.

Einen Aufschluß über den Verbleib des Blutes gibt uns die schon erwähnte Beobachtung von RUBINO, daß nach Alkoholinjektionen in den Herzmuskel unter gleichzeitiger Blutdrucksenkung eine Zunahme des Lebervolumens festzustellen ist. Es ist daher anzunehmen, daß eine Speicherung im Splanchnicusgebiet stattfindet.

Diese Speicherung des Blutes im Gebiet des abdominalen Gefäßsystems wird durch die Abb. 5 bewiesen. Hier erfolgt nach Unterbindung der

Arteria coronaria sinistra im Augenblick der Senkung des Blutdruckes und der Cavadurchblutung eine starke kurz anhaltende Durchblutungssteigerung der oberen Mesenterialarterie, die für eine Auffüllung dieses Gefäßgebietes bei fehlendem Abstrom hinweist.

Nach den hier dargelegten Versuchen folgen auf den experimentellen Verschluß bei einem Teil der Versuchstiere:

1. Abnahme des Minutenvolumens und des Blutdruckes durch eine Verminderung der zum Herzen zurückströmenden Blutmenge und damit der vom Herzen zu leistenden Arbeit.

2. Zunahme der Coronardurchblutung, die einer besseren Blutversorgung des Herzens im Augenblick der Bedrohung dient.

In den so reagierenden Fällen läßt sich meistens ebenso wie bei den Katzen durch Ausschaltung der Vagi die Kreislaufveränderung rückgängig machen. Es kommt dabei zu einem Anstieg des Blutdruckes unter einer Zunahme des zum Herzen zurückströmenden Blutes. Die ungünstige Wirkung der Vagusausschaltung äußert sich dann oft auch in einer Zunahme des Vorhofdruckes. Damit kann auch gesagt werden, daß der Eintritt dieser Kreislaufreaktion eine frühzeitige Insuffizienz des Herzens verhindert, da ihre Beseitigung sehr bald Zeichen einer beginnenden Herzinsuffizienz eintreten läßt. Es ist weiterhin von Bedeutung, daß mehrfach kurz nach Ausschalten der Vagi der Tod des Versuchstieres unter Kammerflimmern erfolgte. Dieser Befund stellt eine Parallele zu den Beobachtungen Porters dar, daß das Kammerflimmern nach dem Coronarverschluß besonders dann eintritt, wenn die vom Herzen zu leistende Arbeit gesteigert wird. Damit ist die günstige Bedeutung dieses in Abb. 4 dargestellten Kreislaufverhaltens beim Coronarverschluß sehr eindeutig definiert.

Die mit Kollaps verlaufende Form des Herzinfarktes scheint bei Hunden etwas seltener zu sein als bei Katzen, allerdings ist dieses Urteil nur mit Vorsicht zu stellen, da ja nicht festzustellen ist, welchen Verlauf die zahlreichen Versuche, die durch Kammerflimmern frühzeitig endeten, sonst genommen hätten. Auch bei diesen Versuchen konnten mehrfach Ansätze zu einem Kollaps noch vor dem Kammerflimmern beobachtet werden. Von den 15 überlebenden Hunden bekamen 9 nach der Coronarunterbindung einen Kollaps, 7 davon mit deutlichen Gefäßreaktionen im Sinne des Bezold-Effektes. In 2 Versuchen war bei einer Erniedrigung des Blutdruckes gleichzeitig das Minutenvolumen und die periphere Durchblutung erhöht. In 2 Fällen trat nach dem Coronarverschluß weder eine Blutdruckreaktion noch eine Durchblutungsveränderung auf.

Bei einem Teil der rasch nach dem Coronarverschluß ad exitum gekommenen Hunde war eine akute Insuffizienz des Herzens im Anschluß an eine Arrhythmie zu beobachten, die sich in einem rapiden Anstieg des Vorhofdruckes manifestierte. In diesen Fällen, die meist 10—12 Min. nach der Ligatur starben, war eine eindeutige Blutdruck- und Gefäßreaktion

nicht zu verzeichnen, es kamen sowohl Steigerungen, wie auch Senkungen dieser Größen zustande. Die Beurteilung dieser Verläufe ist dadurch nicht einwandfrei möglich, daß die Dilatation des Herzens in der akuten Insuffizienz zu einer Abklemmung der A. coronaria d. durch das anliegende Thermoelement und auch zu einer Störung des unmittelbar unterhalb des Herzens an der V. cava inf. angelegten Elementes führen kann.

Vereinzelt (bei 3 von 15 Tieren) waren auch bei Hunden Steigerungen des Blutdruckes als Folge des experimentellen Coronarverschlusses festzustellen, ohne daß dabei ein Anstieg des Vorhofdruckes zu verzeichnen war. Bei einem Versuchstier nahm sogar der vorher erhöhte Vorhofdruck nach Unterbindung des linken Coronargefäßes ab, unter gleichzeitigem Verschwinden einer vorher bestehenden Arrhythmie. Diese Beobachtung würde das Ergebnis von Orias bestätigen, der mehrfach nach experimentellem Coronarverschluß eine Verstärkung der Systole feststellen konnte, die er als eine Kompensationsmaßnahme gedeutet hat.

Für kompensatorische Vorgänge in diesen Fällen spricht auch die von Gollwitzer-Meier und Kroetz festgestellte besondere Bedeutung des Blutdruckverhaltens für die Einstellung des Coronardurchstromes, der nach Ansicht dieser Autoren zu etwa zwei Drittel durch Veränderungen des Blutdruckes reguliert wird, während von der vasomotorischen Regulation nur ein Drittel der Gesamtvolumenveränderung bestritten wird. Der Veränderung der Gefäßweite käme demnach nach Ansicht genannter Autoren nur die Bedeutung einer Feineinstellung zu.

Bei der Reaktion der Blutdrucksteigerung konnte mehrfach nach Ausschaltung der Vagi Senkung des Blutdruckes und gleichzeitig Zunahme des Vorhofdruckes beobachtet werden. Diese Reaktion spricht dafür, daß dem Vagus auch in diesem Fall eine schützende Funktion zukommt. Das Verhalten der Coronardurchblutung in diesen mit Blutdrucksteigerung nach dem Coronarinfarkt reagierenden Fällen ist meist blutdrucksynchron, was ja auch der hohen Wertigkeit der Regulation durch den Blutdruck entspricht. Es ist demnach hier die Abnahme des Blutangebotes bedeutsamer für die Veränderung des Stromvolumens als der Wegfall der Dauerkonstriktion durch den Vagus. Für gewöhnlich wird sonst nach Ausschaltung der Vagi regelmäßig eine Zunahme des Coronardurchstromes beobachtet (Gollwitzer-Meier und Kroetz).

Es ist hier besonders wichtig, daß bei den auf den Coronarverschluß mit Blutdrucksenkung reagierenden Tieren wiederholt nach Ausschaltung der Vagi trotz erheblichen Blutdruckanstieges eine Abnahme der Coronardurchblutung festgestellt werden konnte. Ein Verhalten, das nur verständlich ist, wenn zielgerichtete, nutritive Schutzmaßnahmen als Ursache der Reaktion angenommen werden. Es kann also die Bedeutung des Blutdruckverhaltens in diesem Fall nicht so entscheidend für das Verhalten des Coronarstromes sein. Die vermindernde Wirkung der Blutdrucksenkung auf den Coronarstrom wird bei weitem durch Abnahme des Widerstandes im Coronarstrombett ausgeglichen und gewissermaßen überkompensiert,

so daß es trotz Kollaps zu einer oft erheblichen Mehrdurchblutung der Coronargefäße kommt. Dieses Verhalten beweist, daß es sich um einen reflektorischen Vorgang handelt, der der eigentlichen coronarkonstriktorischen Vaguswirkung übergeordnet ist.

Die ungünstige Wirkung der Vagusausschaltung ist für beide Formen der Reaktion durch den häufig zu beobachtenden Druckanstieg im Vorhof gekennzeichnet, der bei Einschaltung der Vagi wieder zurückgeht.

Die Bedeutung der Vagi liegt, abgesehen von diesen rein vasodynamischen Vorgängen zweifellos auch noch in ihrer energetischen Wirkung begründet. Die Tonussteigerung dieses Nerven bewirkt am Herzen eine Einsparung von Sauerstoff (Wezler, Gremels, Bohnenkamp), die für die Ökonomie der Herzarbeit besonders unter ungünstigen Durchblutungsverhältnissen entscheidend sein kann. Es ist daher anzunehmen, daß außer den hier beschriebenen hämodynamisch-vasomotorischen Veränderungen beim Herzinfarkt, die ohne Zweifel mit einem Reizzustand der Vaguszentren zusammenhängen (Hochrein), sich auch an der Energetik des Herzens durch Einsparung des Sauerstoffverbrauches Vorgänge abspielen, die eine günstige Auswirkung haben. Die besondere Bedeutung dieser Beobachtungen für die Klinik, die an anderer Stelle noch ausführlicher besprochen werden soll, liegt in der Tatsache, daß prognostisch der Verlauf des Coronarinfarktes auch im Tierversuch günstiger ist, wenn im Anschluß an die Coronarunterbindung ein Kollaps eintritt, ein Befund, der die klinischen Beobachtungen von Fischberg, Hitzig und King vollauf bestätigt. Das bedrohliche Kammerflimmern wie auch das frühzeitige Versagen des Herzens sind bei der unter Blutdrucksenkung verlaufenden Form seltener als bei jeder anderen Reaktionsart.

Zusammenfassung der Ergebnisse. I. Teil.

Die nach experimentellem Myokardinfarkt eintretenden Kreislaufveränderungen können verschiedenen Verlauf zeigen, die sich im wesentlichen durch Unterschiede im hämodynamischen Verhalten kennzeichnen. Generell lassen sich etwa folgende 5 Verlaufsformen voneinander abgrenzen:

1. Akuter Tod durch Kammerflimmern, wenige Minuten nach dem Coronarverschluß, ohne daß vorher nennenswerte Kreislaufveränderungen eintreten.

2. Rasch einsetzende Insuffizienz und Versagen des Herzens mit baldigem letalem Verlauf, ohne erhebliche vasomotorisch deutbare Veränderungen.

3. Erhebliche Senkung des Blutdruckes und Minutenvolumens bei gleichzeitig zunehmender oder unveränderter Durchblutung im intakten Kranzgefäß. Verminderung der zirkulierenden Blutmenge durch Speicherung in Splanchnicusgebiet. Abnahme der peripheren, nicht lebensnotwendigen Durchblutung. Diese Veränderungen des Kreislaufes sind bei dieser Verlaufsform durch Ausschaltung der Vagi wieder rückgängig zu machen. Der unveränderte Vorhofdruck zeigt die rein vasomotorische Entstehung dieser Vorgänge an (prognostisch günstiger Verlauf).

4. (Vereinzelte Verlaufsform.) Anstieg des Blutdruckes mit Abnahme des Minutenvolumens, wobei die Coronardurchblutung gesteigert oder vermindert sein kann. Nach Ausschaltung der Vagi Senkung des Blutdruckes unter Zunahme des Minutenvolumens. Ebenfalls fehlende Insuffizienz des Herzens (prognostisch günstig).

5. (Vereinzelte Reaktionsform.) Anstieg des Blutdruckes mit Zunahme des Minutenvolumens und wechselndem Verhalten der Coronardurchblutung (prognostisch weniger günstig).

Die an den überlebenden Tieren am häufigsten beobachtete Verlaufsform nach Punkt 3 entsteht durch den Bezold-Jarisch-Effekt, indem auf dem Wege der Reizung sensibler Endigungen im Herzmuskel reflektorisch eine Entlastung des Kreislaufes hervorgerufen wird, die auf folgendem Funktionsmechanismus beruht:

1. Blutdrucksenkung, 2. Abnahme des Minutenvolumens, 3. Abnahme der zirkulierenden Blutmenge (Speicherung im Splanchnicusgebiet).	damit Senkung der vom Herzen zu leistenden mechanischen Arbeit.
4. Zunahme der Durchblutung des noch intakten Coronargefäßes, 5. Verminderung des Sauerstoffverbrauches bzw. Verbesserung der Sauerstoffutilisation durch Steigerung des Vagustonus.	Nutritiver Schutz des geschädigten Herzens, Ökonomisierung der Herzarbeit.

Diese Verlaufsform ist prognostisch die weitaus günstigste, was sich mit klinischen Erfahrungen deckt.

Die unter Punkt 4 und 5 unter den verschiedenen Verlaufsformen geschilderten Kreislaufveränderungen scheinen nicht eindeutig einen so klar zielgerichteten Vorgang zum Schutze des Herzens darzustellen, wie die oben geschilderte Reaktion; aber auch hier kann im Anstieg des Blutdruckes bei gleichzeitiger Abnahme des Minutenvolumens eine kompensatorische Maßnahme zur Verbesserung der Durchblutung des bedrohten Herzens gesehen werden.

Diese Verlaufsformen, die sich mühsam aus der Fülle der Erscheinungen herausschälen lassen, kommen nicht immer in reiner Form vor, sondern überschneiden sich und können ineinander übergehen. Diesen fünf experimentell analysierten Verlaufsformen des Myokardinfarktes können auch beim Menschen entsprechende klinisch beobachtete Verläufe in Parallele gesetzt werden:

1. Sekundenherztod durch Kammerflimmern.

2. Frühinsuffizienz mit akut einsetzendem Lungenödem und Exitus.

3. Verlauf unter Kollapserscheinungen, die in fast allen Einzelheiten den unter Punkt 3 beschriebenen Beobachtungen entsprechen (die häufigste und prognostisch günstigste Verlaufsform).

4. und 5. Nach Angaben der Literatur werden auch beim Menschen gelegentlich Blutdrucksteigerungen nach dem Myokardinfarkt beobachtet.

II. Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Pharmaka nach experimentellem Myokardinfarkt.

(Sympatol, Strophanthin, Chinin, Chinidin, Veratrin.)

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die mit einem Kollaps verlaufende Form des Myokardinfarktes mit Veränderungen des gesamten Kreislaufes einhergeht, die reflektorisch ausgelöst wird und eine sinnvolle Schutzmaßnahme zur Entlastung des bedrohten Herzens darstellt. Auf dem Wege des Bezold-Jarisch-Effektes kommt es nach dem Coronarverschluß durch Reizung sensibler Endigungen zur Abnahme des Blutdruckes, des Minutenvolumens und Senkung der zirkulierenden Blutmenge, die durch Verminderung der Durchblutung nicht lebenswichtiger Organe erreicht wird, während gleichzeitig die Durchblutung des Herzens zunimmt. Die vom Herzen zu leistende Arbeit ist durch diesen Vorgang verringert.

Diese Erkenntnis läßt, wie schon Dietrich und Schimert auf Grund einer Idee von Dietrich festgestellt haben, im Kollaps beim Herzinfarkt nicht ein unbedingt zu bekämpfendes Symptom sehen, sondern im Gegenteil oft einen Zustand, der durch Entlastung des Herzens zur Erhaltung des Lebens dient. Durch die Erkennung dieser nunmehr auch experimentell erhärteten Tatsache kann sich auch unsere therapeutische Einstellung zu diesen Veränderungen grundsätzlich ändern. Es ist deshalb berechtigt, wenn wir unser therapeutisches Rüstzeug erneut durchmustern im Hinblick darauf, ob und in welcher Weise eine Beeinflussung dieser als günstig erkannten Schutzvorgänge durch die Therapie erfolgt. Denn es scheint denkbar, daß alle diejenigen therapeutischen Eingriffe als ungünstig anzusehen sind, die den Eintritt der beschriebenen Schutzvorgänge verhindern oder sie beseitigen. Deshalb wurden bezüglich ihrer Wirkung im Zustand des Kollapses nach dem Coronarverschluß Sympatol, Strophanthin, Chinin, Chinidin und Veratrin untersucht.

Die Methodik war die gleiche wie oben beschrieben. Nach Einstellung des Kollapses und der im ersten Teil der Arbeit dargestellten Veränderung des Kreislaufes wurden dann die genannten Pharmaka intravenös verabreicht und ihre Wirkung fortlaufend registriert.

Versuchsergebnisse.

Zunächst interessierte die Frage, festzustellen, welche Wirkung die blutdrucksteigernden Mittel haben, da es sehr naheliegend ist, bei dem schweren Kollaps, der den Myokardinfarkt zu begleiten pflegt, irgendeine solche Substanz zu versuchen. Unter den zahlreichen uns zur Verfügung stehenden Kreislaufmitteln schienen vor allem diejenigen von Interesse, die an der Peripherie angreifen. Die zentral angreifenden Analeptika werden nur in den seltensten Fällen für die Therapie des Myokardinfarktes empfohlen; offensichtlich, weil erfahrungsgemäß eine Erregung des Zentralnervensystems sich ungünstig auswirkt.

Sympatol.

Wohl von den meisten Autoren wird bei therapeutischen Ratschlägen das Sympatol in den Vordergrund gestellt (v. Bergmann, Hochrein, Uhlenbruck u. a.). Betrachten wir nun den Einfluß der peripher angreifenden Kreislaufmittel auf die Leistung des Herzens (Schlagvolumen, Minutenvolumen) und auf die Verhältnisse im arteriellen System (Windkessel, Elastizität, Strömungswiderstand), so kommen wir auf Grund der Arbeiten von Wezler und Böger sowie von Meyer und Spiegelhoff zu folgender Feststellung: Alle diese Substanzen (Adrenalin, Ephetonin, Sympatol, Suprifen, Thyramin, Veritol) verursachen eine bedeutende Zunahme des Stromvolumens und damit eine Steigerung der vom Herzen zu leistenden Arbeit. Es findet bei jedem dieser Mittel eine Zunahme des Schlagvolumens statt, die besonders für das Sympatol erheblich ist. Auf Grund dieses Befundes nehmen Meyer und Spiegelhoff eine primäre sympathicotrope Reizwirkung auf das Herz selbst an, die außer der Entleerung der Blutdepots, die ein erhöhtes Blutangebot an das Herz herbeiführen, als eine der Hauptwirkungen dieser Stoffe anzusehen ist. Durch diese Erkenntnis muß sich die einseitige Betrachtung der peripheren Einflüsse dieser Stoffe, die bei der Mehrheit immer noch besteht, wandeln. Aus diesem Grunde auch verdienen diese Stoffe in bezug auf die Frage ihrer Anwendbarkeit beim Herzinfarkt eine ganz besondere Beachtung, da wir ja festgestellt haben, daß ein Antrieb des Herzens und eine wesentliche Erhöhung der Herzarbeit im Kreislaufkollaps nach dem Herzinfarkt nicht erwünscht ist.

Etwas günstiger — von diesem Gesichtswinkel aus gesehen — ist der Befund von Meyer und Spiegelhoff in bezug auf die Wirkung dieser Stoffe auf den peripheren Gefäßwiderstand. Dieser erfährt bei den meisten dieser Substanzen, geprüft an Herzgesunden, keine nennenswerte Erhöhung. Diese Feststellung gilt besonders für das Adrenalin und das Sympatol. Durch eine günstige Adaptation der einzelnen Kreislauffaktoren (Windkessel, Elastizität usw.) wird die Erhöhung des Minutenvolumens meist ohne Zunahme des peripheren Widerstandes ausgeglichen. Es findet sich also für die genannten Mittel ein besonders „weich arbeitender" Windkessel. Dieser Befund ist deshalb wichtig, weil wir aus den schon eingangs erwähnten Untersuchungen von Porter wissen, daß das Infarktherz unter erhöhtem Widerstand in gesteigertem Maße zum Kammerflimmern neigt.

In den eigenen Untersuchungen interessierte besonders die Wirkung des Sympatols bei dem Infarktverlauf, der mit einem Kollaps und einer Verminderung des Minutenvolumens einherging.

Das Mittel wurde immer erst mindestens 20 Min. nach Anlegung des Coronarverschlusses (Ramus descendens der A. coronaria sinistra) verabreicht, möglichst, nachdem sich die Kreislaufverhältnisse nach anfänglichen Schwankungen einigermaßen ausgeglichen haben und konstant geworden sind.

Unmittelbar nach der Injektion von 1 ccm Sympatol (Abb. 6) intravenös, kommt es zu einer kurzen Abnahme der Pulmonalisdurchblutung, die aber dann bei langsamer Zunahme des Blutdruckes sich allmählich deutlich über den Ausgangswert steigert. Damit kann mit Sicherheit ausgesagt werden, daß das Zeitvolumen durch das Sympatol eine Zunahme erfährt. Die Coronardurchblutung ist von Anfang an deutlich vermehrt, die Zunahme beginnt aber erst im Augenblick des Anstiegs des Blutdruckes und der Pulmonalisdurchblutung. Der Vorhofdruck erfährt eine geringe Erniedrigung. Es ist interessant, festzustellen, *daß nach dem Infarkt im Gegensatz zu anderen Kollapsformen durch das Sympatol nie eine starke*

Erhöhung des Blutdruckes zu beobachten war. Ähnliche Feststellungen sind klinisch auch schon von HOCHREIN getroffen worden. In einem der Versuche konnte kurz nach der Sympatoldarreichung eine erhebliche Abnahme des Blutdruckes unter gleichzeitigem Anstieg des Venendruckes beobachtet werden. Dieses Tier kam kurz nach der Sympatolgabe ad exitum. Wir sehen weiterhin aus der Kurve, daß kurz nach dem Beginn des Blutdruckanstieges eine Arrhythmie einsetzt, die im ganzen Verlauf der Kurve mit geringen Unterbrechungen andauert. Die Arrhythmien sind, soweit festgestellt werden konnte, extrasystolischer Natur. Ob diese Herzrhythmusstörungen ähnlich zu bewerten sind wie die von KLOSTERMEYER und JONSSON

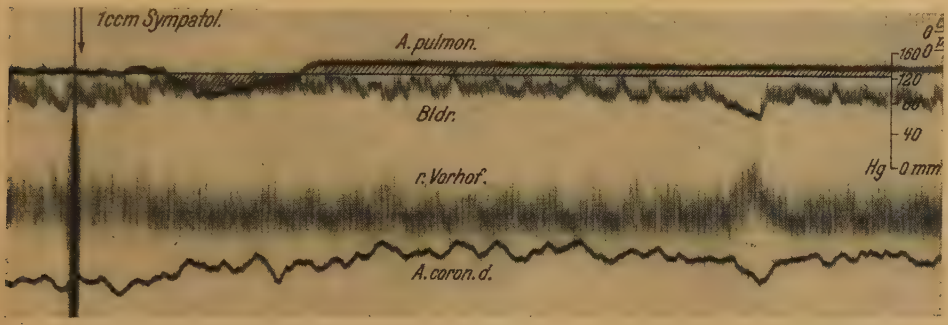


Abb. 6. Hund in Chlorasenarkose: Durchblutung der A. pulm., der A. coronaria d. Blutdruck in der A. femoralis. Druck im rechten Vorhof. Wirkung von 1 ccm Sympatol nach Unterbindung der A. coronaria s.

sowie von ASCHENBRENNER und CODAS-THOMPSON nach toxischen Veritolgaben nachgewiesenen, bleibt als Frage dahingestellt. Wahrscheinlich ist der Grund dafür in der nach dem Infarkt sehr gesteigerten Tendenz zur heterotopen Reizbildung zu suchen, die eben solche Reize durch Einwirkungen entstehen läßt, die normalerweise nicht zu abnormer Reizbildung führen. Dieser Befund mahnt auch ohne bekannte entsprechende klinische Erfahrungen in Hinblick auf das drohende Kammerflimmern zu besonderer Vorsicht.

Wir sehen also auf Grund dieser Befunde, daß die günstige Wirkung des Sympatols beim Herzinfarkt sehr in Frage gestellt ist, da auch in dieser Versuchsanordnung durch Sympatol eine Steigerung der Herzarbeit durch Zunahme des Minutenvolumens vermutet werden muß. Auch die günstige Beeinflussung der Coronardurchblutung, die besonders von HOCHREIN angeführt wurde, kann diesen Einwand nicht genügend entkräften, da ja der Blutbedarf des Herzens bei steigernder Arbeitsleistung zwangsläufig zunehmen muß, wie dies die grundlegenden Untersuchungen von REIN gezeigt haben. Abgesehen davon führt die sympathicotrope Beeinflussung zu einer Zunahme des Sauerstoffverbrauches (WEZLER, GREMELS), die ebenfalls einen zwangsläufigen Mehrbedarf der Coronar-

durchblutung herbeiführt, wie dies die Befunde von Kroetz einwandfrei erwiesen haben. So kann also die Steigerung der Coronardurchblutung durch Sympatol nicht unbedingt als eine günstige Wirkung angesehen werden, sondern sie kann Ausdruck eines erhöhten Sauerstoffverbrauches bzw. eines vermehrten Blutbedarfes bei erhöhter Leistung des Herzens sein.

Strophanthin.

Die zweite vom Standpunkt der Therapie zu erörternde Frage ist die Wirkung der *Herzglykoside* beim Herzinfarkt, um so mehr, als in dem unfangreichen Schrifttum sehr verschiedene Ansichten vertreten werden. Von den Herzglykosiden, die zur Behandlung der Folgeerscheinungen des Herzinfarktes angewendet werden, hat sich zweifellos das von Fraenkel eingeführte *Strophanthin* den ersten Platz erobert und auch behauptet. Ich habe mich daher im Rahmen dieser Arbeit zunächst auf dieses Herzglykosid beschränkt. Edens, wohl der stärkste Verfechter der frühzeitig einzusetzenden Strophanthintherapie beim Myokardinfarkt, hat sich gerade auch in letzter Zeit mit den zahlreichen Einwänden dagegen auseinandergesetzt und die oft geradezu schlagartige Wirkung des Strophanthins in kleinen Dosen auf den gesamten Allgemeinzustand beim Herzinfarkt betont. Er nimmt auf Grund klinischer Beobachtungen eine Zunahme der Coronardurchblutung durch die Verbesserung der Systole an, die einer weiteren Ausbreitung des Infarktes hemmend im Wege stehen soll. Mit der gleichen Begründung tritt auch Blumberger für den sofortigen Einsatz der Strophanthintherapie ein. Im Gegensatz zu diesen Autoren sieht Weber eine Gefahr in der Strophanthintherapie durch Loslösung von Thromben aus dem linken Ventrikel infolge der verstärkten Systole. Die gehäuften Embolien nach Myokardinfarkten scheinen für diese Auffassung zu sprechen. In gleicher Weise lehnt auch Fraenkel die Therapie des Infarktes mit Strophanthin im akuten Stadium ab mit einem Hinweis auf die Wichtigkeit der Ruhigstellung des Herzmuskels. Büchner nimmt an, daß die durch Strophanthin gesteigerte Leistung des Herzmuskels eine Steigerung des Sauerstoffbedarfes und damit eine Steigerung der Coronarinsuffizienz verursacht. Rhythmusstörungen, die oft auch nach therapeutischen Dosen beobachtet wurden und experimentell bei Überdosierung regelmäßig feststellbar sind, mahnen nach Ansicht von Jagić und Zimmermann sowie Travell, Gold und Modell wegen des drohenden Kammerflimmerns zur Vorsicht. Andere Autoren (v. Bergmann, Hochrein, Uhlenbruck) beschränken die Anwendung des Strophanthins auf die Phase der eintretenden Herzinsuffizienz, in der aber diese Form der Therapie einzig und allein als lebensrettend angesehen werden muß. Von Arbeiten, die sich mit diesen Fragen auseinandersetzen, sind noch unter zahlreichen anderen die von Donath, Master, Jaffé und Dack zu nennen.

Auch die bisher vorliegenden experimentellen Untersuchungen über die Wirkung des Strophanthins auf den Coronarkreislauf brachten bis jetzt keine eindeutige Klärung dieser Frage. Frühere Untersuchung am Starling-Präparat (Rühl, Rühl und Wiehler, Gollwitzer-Meyer und Krüger, Rössler u. a.) ergaben gewöhnlich eine Coronarverengerung durch die Strophanthineinwirkung. Diese Befunde ließen unter Berücksichtigung ebenso deutbarer klinischer Zeichen wie stenokardischer Anfälle nach Überdosierung von Strophanthin die Auffassung entstehen, daß auf dem Wege der Steigerung des Vagustonus durch die Digitalisglykoside auch am Ganztier eine Coronarverengung verursacht wird. Diese Annahme wurde durch Untersuchungen von Büchner und Remé unterstützt, die nach Strophanthindarreichung bei Kaninchen elektrokardiographische Veränderungen feststellten, wie sie sonst bei Coronarinsuffizienz beobachtet werden können. Diese Ergebnisse wurden aber später schon durch die Untersuchungen von Gremels in Frage gestellt, der auf die Wichtigkeit

der richtigen Dosierung durch seine Untersuchungen über die Beeinflussung der Herzenergetik durch Strophanthin hinwies. Rühl selber hat später angenommen, daß infolge der von ihm nachgewiesenen Verbesserung der Sauerstoffutilisation durch das Strophanthin die Abnahme der Coronardurchblutung durch den sinkenden Blutbedarf erklärt wird. Weiterhin muß festgestellt werden, daß die am denervierten Starling-Präparat erhobenen Befunde in bezug auf die Coronardurchblutung infolge der völligen Veränderung der Tonuslage (Ausfall der Dauerkonstriktion durch den normalen Vagustonus) nicht ohne weiteres auf den Normalzustand übertragen werden können. Neuere Untersuchungen haben ergeben, daß nach Durchschneidung der Vagi weitere Erweiterungen der Coronargefäße nicht mehr gut möglich sind.

Zum erstenmal hat Hochrein unter physiologischeren Verhältnissen am Ganztier die Coronardurchblutung unter Einwirkung von Digitalisglykosiden untersucht. Er kam zu dem Schluß, daß eine nennenswerte Beeinflussung der Coronargefäße selbst durch diese Stoffe nicht stattfindet. Die von Osterwald unter Berücksichtigung des Minutenvolumens und des Vorhofdruckes durchgeführten Untersuchungen konnten feststellen, daß eine direkte Beeinflussung der Coronardurchblutung durch das Strophanthin scheinbar nicht stattfindet, daß aber mit Zu- und Abnahme des Minutenvolumens sich die Coronardurchblutung unter Strophanthineinwirkung gleichsinnig verhält. Die Änderung des Minutenvolumens sowohl im Sinne der Steigerung wie im Sinne der Abnahme wurde von Osterwald auf eine periphere Gefäßwirkung bezogen. Zu ähnlichen Ergebnissen ist auch Hildebrandt gekommen, der nachweisen konnte, daß bei dem insuffizienten Herzen bei der durch Strophanthin bewirkten Steigerung des Minutenvolumens und damit der Herzleistung auch die Coronardurchblutung erhöht wird. Erst Kroetz hat auf Grund experimenteller Untersuchungen festgestellt, daß den Digitalisglykosiden eine eigene Wirkung auf die Coronardurchblutung zukommt. Hansjürgen Oettel und G. Schimert jun. fanden bei vergleichenden Untersuchungen von verschiedenen Strophanthusglykosiden, daß für das K-Strophanthin eine besondere Coronarwirkung nicht feststellbar war, dagegen aber das K-Strophanthosid und das G-Strophanthin bei einem Teil der Versuchstiere eine Steigerung der Coronardurchblutung hervorriefen, die nicht mit der Minutenvolumenänderung parallel ging. Sie sahen darin eine Bestätigung der vielfach günstigen Wirkung kleiner Strophanthindosen bei der Coronarinsuffizienz, auch dann, wenn keine ausgesprochene Herzschwäche besteht.

Diese recht verschiedenen Ergebnisse rechtfertigen den Entschluß, die Wirkung des Strophanthins unter den besonderen Bedingungen des Zustandes nach einem Coronarverschluß nochmals zu untersuchen, da nur diese Art des Experimentes wirkliche Schlüsse auf die Wirkung unter den völlig veränderten Verhältnissen erlaubt.

Abb. 7 zeigt die Wirkung von 0,1 mg K-Strophanthin bei einem Hund, an dem eine halbe Stunde vorher durch Unterbindung des absteigenden Astes der linken Kranzarterie ein Herzinfarkt erzeugt wurde. Der Hund reagierte auf den Coronarverschluß mit Abnahme des Blutdruckes (40 mm) und des Minutenvolumens. Die Coronardurchblutung war dabei nicht verändert. Es tritt sehr rasch nach der Injektion eine sehr erhebliche Steigerung der Coronardurchblutung ein, die weder durch eine Zunahme des Minutenvolumens noch durch einen Anstieg des Blutdruckes oder der Frequenz verursacht sein kann. Ein geringer vorübergehender Anstieg des Blutdruckes um etwa 20 mm findet erst später statt. Bedeutsam ist dabei die im zweiten Teil der Kurve sichtbare allmähliche Abnahme der

Pulmonalisdurchblutung, die ein Sinken des Minutenvolumens anzeigt. Trotz dieser Abnahme des Minutenvolumens, die auch eine Abnahme der Herzarbeit bedeutet, bleibt die Coronardurchblutung stark erhöht. Sie nimmt auch mit dem allmählichen Wiederabsinken des Blutdruckes nicht ab. Etwa 10 Min. nach der Injektion von Strophanthin tritt zum Zeichen der Glykosidwirkung eine geringe Abnahme des vorher etwas erhöhten Vorhofdruckes ein. Bemerkenswert bei dem gesamten Reaktionsverlauf ist die lange Dauer der Wirkung, die nach 30 Min. noch weiter unverändert anhält. Auch die Frequenz nimmt allmählich etwas ab. Von 4 Versuchen mit Strophanthin zeigten 2 Versuchstiere diese Reaktion, bei einem weiteren Versuchstier war die Coronardurchblutung nur gering erhöht. Ein Hund zeigte nach 0,05 mg Strophanthin keinen Gefäß- oder Blutdruckeffekt. Berücksichtigt man nun noch die durch die Untersuchungen von GREMELS und RÜHL nachgewiesene günstige Wirkung des Strophanthins auf den Sauerstoffbedarf und die Sauerstoffausnutzung des Herzens, so muß in diesem Befund eine geradezu optimale Wirkung des Strophanthins im Zustand des Herzinfarktes gesehen werden. Dieser Effekt ist in seiner Zweckmäßigkeit, die in jeder seiner Phasen gegen die Bedrohung des Herzens gerichtet ist — wenn man überhaupt im Rahmen einer nüchternen wissenschaftlichen Arbeit den schon ein höheres Werturteil bedeutenden Begriff der Zweckmäßigkeit in diesem Sinne gebrauchen darf — einfach faszinierend: Verminderung der Belastung des Herzens durch Abnahme des Minutenvolumens unter gleichzeitiger Zunahme der Coronardurchblutung, die nur nutritiv gedeutet werden kann. Man sieht also, daß der als günstig erkannte BEZOLD-JARISCH-Effekt durch

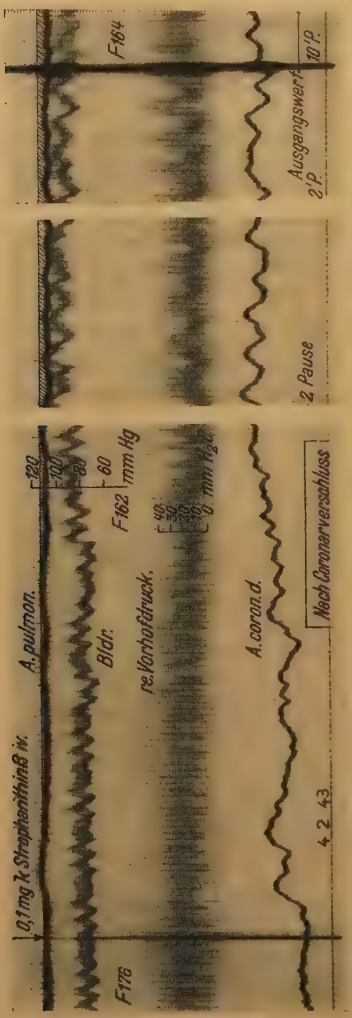


Abb. 7. Registrierung wie in Abb. 6. 20 Min. vorher Unterbindung der A. coronaria s. Wirkung von 0,1 mg Kombetin (K-Strophanthin β). Starke blutdruckunabhängige Zunahme der Coronardurchblutung bei gleichbleibendem, später etwas gesenktem Minutenvolumen. Geringer Anstieg des Blutdruckes.

das Strophanthin keineswegs aufgehoben wird, ja sogar noch vielleicht eine weitere Vertiefung erfährt. Damit wäre auch die Annahme von Jarisch und Richter erwiesen, daß Digitalis auch irgendwo über diesen Reflexmechanismus angreift. Wir sehen auch, daß in dieser Art der Reaktion eine sehr starke periphere Komponente der Strophanthinwirkung zum Ausdruck kommt. Diese Veränderungen können nur vasomotorisch erklärt werden. Wir sehen dabei die völlig veränderte Reaktion des erkrankten Organs auf eine Substanz, die unter normalen Verhältnissen eine kaum beachtliche Veränderung im Sinne von vasomotorischen Verschiebungen nachweisen ließ. Besonders für das K-Strophanthin konnte bisher von keinem der Autoren eine nennenswerte Beeinflussung der Coronardurchblutung festgestellt werden, die nicht von der Änderung des Minutenvolumens oder des Blutdruckes abhängig war.

Diese sicher auch periphere Komponente der Strophanthinwirkung ist von Gotsch und Korth schon beschrieben worden. Sie kommt auch in den interessanten Untersuchungen von Scheurer über die Wirkung des Strophanthins auf die Hauttemperatur zum Ausdruck. Es zeigte sich bei diesen Untersuchungen, daß kleine Strophanthindosen eine Abnahme, große Dosen dagegen eine Zunahme der Hauttemperatur verursachen können. Das würde dafür sprechen, daß bei kleinen Dosen die periphere Durchblutung vermindert wird, während große Dosen zu einer Steigerung der peripheren Durchblutung und damit auch vermutlich zu einer Zunahme der vom Herzen zu leistenden Arbeit führen. Daraus wäre auch ohne eine unmittelbare Wirkung auf die Coronargefäße, die in einem Fall günstige und im anderen Fall ungünstige Wirkung des Strophanthins bei der Coronarinsuffizienz zu verstehen, besonders, wenn wir auch die energetischen Ergebnisse von Gremels, Rühl u. a. berücksichtigen, aus denen hervorgeht, daß kleine Dosen Strophanthin günstig, große Dosen dagegen ungünstig auf die Energetik des Herzens einwirken können. Schon Hochrein hielt diese periphere Komponente der Strophanthinwirkung für die Erklärung des oft sehr günstigen Effektes durch dieses Mittel bei den Myokardinfarkten ohne manifeste Insuffizienz. Durch die hier vorliegenden Untersuchungen müssen wir diese Auffassung zumindest für bestimmte Fälle vollauf bestätigt sehen.

Ganz abgesehen von diesen als sehr günstig anzusehenden hämodynamischen Auswirkungen des Strophanthins, die zweifellos allein schon eine Frühtherapie des Herzinfarktes durch dieses Glykosid gerechtfertigt erscheinen lassen, müssen wir auch noch die energetisch bedeutsame Wirkung der Herzglykoside zur Beurteilung dieser Frage heranziehen.

Wir wissen aus den grundlegenden Arbeiten von Gremels, daß die Erhöhung des Sauerstoffverbrauches des Herzens das erste Zeichen der Herzinsuffizienz ist, schon lange, bevor ein sonst sichtbares Zeichen der mechanischen Leistungsabnahme eintritt und daß genau so das erste Zeichen der Glykosidwirkung eine Verringerung des in der Insuffizienz erhöhten Sauerstoffverbrauches vor der Beseitigung der dynamisch sichtbaren Insuffizienz ist. Es zeigte sich dabei, daß dieser Effekt in bezug auf den Sauerstoffverbrauch des Herzens schon bei außerordentlich kleinen Dosen eintritt, die nach Gremels für Strophanthin bei etwa 0,25—1 γ je Kilogramm Körpergewicht liegen. Wir dürfen daraus schließen, daß zur Erzielung dieser bei der Coronarinsuffizienz und auch bei der beginnenden noch latenten Insuffizienz zweifellos erwünschten Wirkung noch wesentlich geringere Dosen zur Anwendung gelangen können als es zur Zeit allgemein üblich ist. Durch die Möglichkeit der Verringerung der Dosierung, wenn keine Insuffizienz vorliegt, wird auch die Gefahr der Erregung heterotoper Reize wesentlich herabgemindert. Besteht also noch keine manifeste Insuffizienz, so

werden kleinste Strophanthinmengen genügen, um diese ungünstigen energetischen Veränderungen im Stoffwechsel des Herzens günstig zu beeinflussen. Ebenso ist hier zu berücksichtigen, daß die von Rühl für die Strophanthinwirkung nachgewiesene Verbesserung der Sauerstoffutilisation im Gewebe bei gleichem Angebot im Blut eine wesentliche Verbesserung der Sauerstoffversorgung bedeutet. Auch die von mir beschriebenen hämodynamischen Veränderungen treten schon bei relativ geringer Dosierung ein. Es konnten ähnliche Effekte, wie sie in der dargestellten Kurve zum Ausdruck kommen, durch Dosen von 2—5 γ je Kilogramm Körpergewicht hervorgerufen werden.

Liegt also durch die Infarktbildung eine beginnende (klinisch noch keineswegs erkennbare) Insuffizienz des Herzens vor, so muß schon der Sauerstoffbedarf des Herzens infolge der Verschlechterung des Wirkungsgrades, die der manifesten Insuffizienz vorausgeht, erhöht sein. Diese Tatsache wird sich bei den an sich schon schwer anoxisch geschädigten Herzen besonders ungünstig bemerkbar machen und sowohl eine Zunahme der Ernährungsstörung wie auch eine weitere rasche Zunahme der Insuffizienz durch den dadurch entstehenden Circulus vitiosus verursachen. Diese Gefahr wird nun durch die Strophanthinwirkung herabgesetzt, indem der Sauerstoffverbrauch vermindert (Gremels) und der Grad der Sauerstoffausnutzung (Rühl) verbessert wird. So würde also auch diese Überlegung ebenfalls allein schon die frühzeitige Strophanthintherapie des Herzinfarktes inaugurieren lassen. Um so mehr gilt dies nun, nachdem der Nachweis gelungen ist, daß auch die hämodynamischen Auswirkungen des Strophanthins gerade beim Herzinfarkt überaus günstig sind und keineswegs eine Kontraindikation für die frühzeitige Anwendung darstellen können. Im Besitze dieser auf Grund experimenteller Tatsachen erworbenen Kenntnis glaube ich mit aller Entschiedenheit für eine Frühindikation des Strophanthins beim Coronarinfarkt eintreten zu dürfen. Wesentlich ist dabei, daß die Dosenfrage richtig erkannt wird. Liegt keine Insuffizienz vor, so hat sich die Dosierung in sehr niedrigen Grenzen zu halten, ist die Insuffizienz eingetreten, so wird man zur Erzielung eines dynamischen Effektes zu den sonst üblichen Dosen greifen müssen.

Es bleibt demnach als mögliche Gefahr bei der Strophanthintherapie nur noch die zweifellos erwiesene Neigung zu heterotoper Reizbildung, die in der gesteigerten Erregbarkeit des erkrankten Muskels liegt und die Möglichkeit der Embolie durch Loslösung wandständiger Thromben durch die verstärkte systolische Kontraktion des Herzens. Wie wir aus dem weiteren ersehen werden, kann die erstere Gefahr, die durch die geringe Dosierung an und für sich schon stark vermindert wird, unbeschadet für das Herz durch Herabsetzung der Erregbarkeit des Herzens mit Hilfe des Chinins bzw. Chinidins weitgehend gebannt werden. Die Möglichkeit einer Embolie bleibt fraglos bestehen, aber sie gehört doch zu den selteneren Ereignissen. Wir sind deshalb nicht berechtigt, in Befürchtung dieser Zwischenfälle auf die wirksamste therapeutische Maßnahme zu verzichten.

Berechtigterweise fordert deshalb v. Bergmann dieses Recht des Handelns, das für den Chirurgen in der Ausführung einer gefahrvollen, aber unter Umständen als lebensrettend erkannten Operation zur Selbstverständlichkeit geworden ist, auch für uns Internisten.

Chinin, Chinidin.

Durch die Gefahren der Strophanthintherapie beim Myokardinfarkt infolge des drohenden Kammerflimmerns wird unsere Aufmerksamkeit auf die *Chinin*derivate gelenkt, die durch Wenckebach, Frey und v. Bergmann in die Herztherapie eingeführt wurden. Seit 1929 wird von Morawitz und Hochrein angeraten, zur Verhütung des akuten Herztodes nach dem Coronarinfarkt kleine Chinidindosen zu geben, eine Maßnahme, die sich als sehr erfolgreich erwiesen hat.

Mangels bisheriger eindeutiger Untersuchungsergebnisse habe ich selbst versucht, die Wirkung des Chinidins auf die Coronardurchblutung zu erfassen. Es zeigte sich dabei, daß die Coronardurchblutung durch das Chinidin unbeschadet einer eventuellen Regularisierung effektiv durch Gefäßerweiterung gesteigert wird. Diese Wirkung tritt auch beim normalschlagenden Herzen ein. Dabei kann eine Senkung des Blutdruckes unter oft gleichzeitiger Senkung des Minutenvolumens beobachtet werden. Darin ist auch eine Bestätigung der Beobachtung v. Bergmanns zu sehen, daß manche Coronarinsuffizienzen mit Rhythmusstörungen sich allein durch das Chinidin günstig beeinflussen lassen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß eine durch Arrhythmie hervorgerufene akute Insuffizienz des Herzens durch Chinidin im Augenblick der Regularisierung beseitigt wurde. Ein Befund, der neben der therapeutischen Bedeutung des Chinidins auch die nicht immer bewußte fatale Bedeutung der Arrhythmie gerade beim coronargeschädigten Herzen erkennen läßt. Diese Beobachtungen gerade im Zusammenhang mit dem Vorschlag von Morawitz und Hochrein, das Chinidin beim Herzinfarkt anzuwenden, ließen es wichtig erscheinen, auch die Chininderivate unter den gleichen Gesichtspunkten wie die vorerwähnten Mittel einer neuen Untersuchung zu unterziehen.

Abb. 8 zeigt die Einwirkung von Chinin auf die Coronardurchblutung und das Minutenvolumen nach einem Coronarverschluß, der eine Arrhythmie zur Folge hatte. Es tritt sehr rasch nach der Injektion, bevor noch eine Regularisierung festzustellen ist, eine Zunahme der Coronardurchblutung ein, die auch in der Phase des Blutdruckabfalles anhält und nach der Regularisierung weiter ansteigt. Gleichzeitig senkt sich der vorübergehend gesteigerte Vorhofdruck deutlich zum Zeichen dafür, daß die vorher bestandene leichte Insuffizienz des Herzens durch die Regularisierung gebessert wurde. Hier sehen wir zwar einen Anstieg des Minutenvolumens im Augenblick der Regularisierung, dürfen ihn aber nicht als eine wesentliche Zunahme der Herzarbeit bewerten, denn durch die Regularisierung

wird selbstverständlich bei dem gleichen Leistungsaufwand des Herzens eine größere Blutmenge gefördert als im Zustand der Arrhythmie mit ihren ungleichen teilweise frustranen Systolen. Weitere Untersuchungen an Infarkthunden, die nicht arrhythmisch waren, ergaben gewöhnlich eher eine Abnahme des Minutenvolumens. Hier war die Reaktion der von G. SCHIMERT jun. früher beschriebenen Befunde völlig ähnlich. Es tritt also auch durch dieses Mittel keine Durchbrechung des BEZOLD-Effektes ein. Ebenso zeigt die Besserung der Herzinsuffizienz, die aus der dargestellten Kurve klar hervorgeht, daß die ungünstige Wirkung des Chinins bzw. Chinidins auf den Herzmuskel durch Herabsetzung seiner Kontraktilität

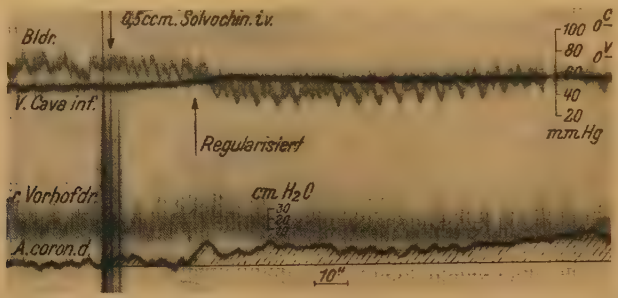


Abb. 8. Hund in Chloralosenarkose: Registrierung wie oben. Wirkung von Chinin nach experimentellem Herzinfarkt in arrhythmischem Zustand. Coronardurchblutung wird gesteigert. Minutenvolumen nimmt nur im Augenblick der Regularisierung etwas zu.

und Reizbarkeit durch den günstigen Effekt der Regularisierung weitgehend aufgehoben wird.

So sehen wir also durch diese Befunde die Forderung von MORAWITZ und HOCHREIN, das Chinidin beim Herzinfarkt frühzeitig anzuwenden, berechtigt, ohne daß durch diese Maßnahme eine nennenswerte Schädigung des Herzens zu befürchten ist. Der damit erreichte Effekt ist doppelt: 1. wird die Gefahr des Kammerflimmerns erheblich herabgesetzt und 2. durch die Verhinderung oder Regularisierung der schon bestehenden Arrhythmie ein äußerst ungünstiges Symptom, das zur Insuffizienz des Herzens wesentlich beitragen kann, beseitigt. Experimentelle Untersuchungen haben einwandfrei erwiesen, daß der Coronarverschluß unter dem Chinidin viel seltener tödlich verläuft als bei den Kontrollfällen (s. Literatur bei HOCHREIN).

Ungeachtet dieser kardialen Wirkung besitzt aber das Chinin und wohl auch das Chinidin eine dämpfende Wirkung auf die vegetativen Zentren und die Stätten des Stoffwechsels, auf die in diesem Zusammenhang besonders v. BERGMANN hingewiesen hat. Auch diese Wirkungskomponente dürfte sich im Zustand des Infarktes keineswegs ungünstig auswirken. So sehen wir in der Kombination von Strophanthin und Chinidin eine vielschichtige und vor allem in allen ihren Wirkungsbereichen zweckmäßig angreifende Therapie.

Weitere Untersuchungen wurden über die Wirkung der Nitrite und der Purinkörper nach dem Coronarverschluß durchgeführt. Hier sind die Untersuchungen noch nicht soweit abgeschlossen, daß eine Publikation der Ergebnisse erfolgen kann. Es darf jedoch vorläufig bemerkt werden, daß die Wirkung dieser Stoffe in dem veränderten Reaktionszustand des Kreislaufes, wie wir ihn nach dem Coronarverschluß vorfinden, nicht wesentlich anders als unter normalen Verhältnissen ist. Diese Substanzen führen zwar zu einer Steigerung der Coronardurchblutung, aber es ist fast regelmäßig dabei eine Zunahme des Zeitvolumens und auch der Frequenz festzustellen.

Bei den Nitriten wurde mehrfach eine Zunahme des Vorhofdruckes gefunden zum Zeichen des ungünstigen Effektes, der auch klinisch sehr oft durch die Unverträglichkeit dieser Präparate nach dem eingetretenen Infarkt bestätigt wird. Diese Ergebnisse sollen zur gegebenen Zeit ebenfalls veröffentlicht werden.

Veratrin.

Es schien von Interesse, auch die Wirkung des *Veratrins* zum Gegenstand der Untersuchung zu machen. Diejenigen Arbeiten, die die Wirkung des Veratrins geklärt haben (v. Bezold und Hirth, Jarisch, Jarisch und Richter, Jarisch und Aman sowie Dietrich und Schimert) zeigten, daß das Veratrin durch Erregung der sensiblen Endigungen im Herzmuskel einen über den Vagus laufenden Schutzmechanismus zur Entlastung des Herzens in Bewegung setzt in ähnlicher Weise, wie er bei einem Teil der Coronarinfarkte offenbar durch die anoxische Schädigung des Herzmuskels ausgelöst wird. Man kann deshalb von dem Veratrinkollaps mit gewisser Berechtigung als von einem Modellversuch für den Kollaps beim Herzinfarkt sprechen (S. Dietrich und G. Schimert jun.), an dem sich die Kreislaufveränderungen nach dem Infarkt studieren lassen. Jarisch konnte zeigen, daß das Veratrin nicht nur den Bezold-Effekt auslösen, sondern auch für seine Entstehung in erheblichem Maße sensibilisieren kann, so daß unterschwellige Dosen anderer Stoffe im gleichen Sinne, wie sonst nur wesentlich größere Dosen wirken.

So tritt z. B. nach Vorbehandlung mit Veratrin nach einer KCl-Dosis, die sonst keinen Kollaps hervorruft, eine typische Blutdruckerniedrigung im Sinne des Bezold-Effektes ein. Dieser Befund ist für uns besonders deswegen interessant, weil Jarisch auf Grund zahlreicher Versuche annimmt, daß das Kalium der eigentliche Stoff ist, der den Bezold-Effekt auslöst. Wie bekannt, wird das Kalium durch die Zerstörung der Zellmembranen frei, wahrscheinlich auch im Zustand der Infarktnekrose. Wenn also Kalium der adäquate Reiz zur Auslösung dieses Mechanismus ist, so müßte das Veratrin auch für den Fall des Coronarverschlusses eine Sensibilisierung hervorrufen, und damit die Bereitschaft für die Entlastungsreaktion im Sinne des Bezold-Effektes gesteigert werden. Weiterhin könnte unter Umständen durch kleine Veratrindosen nach einem Coronarverschluß diese fehlende Kreislaufumstellung hervorgerufen werden. Es ist interessant, hier zu bemerken, daß die Homöopathie das Veratrin besonders beim Herzinfarkt als Therapeuticum sehr hoch einschätzt auf Grund der Ähnlichkeit der Veratrinwirkung mit dem Kollaps beim Herzinfarkt (Schimert sen.). Von der akademischen Medizin sind bis jetzt ähnliche therapeutische Versuche mit Veratrin nicht durchgeführt worden.

Auch diese zuletzt erwähnte Tatsache hat mich dazu angeregt, mit dem Veratrin einen therapeutischen Versuch bei dem experimentellen Coronarverschluß zu unternehmen in der gleichen Art, wie es für die vorstehenden Untersuchungen der Fall war. In Abb. 9 ist die Wirkung von 0,25 mg Veratrin bei einem Hund zu sehen, bei dem 20 Min. vor der Veratrininjektion ein Coronarverschluß durch Unterbindung des absteigenden Astes des linken Kranzgefäßes erzeugt wurde.

Etwa 20 Sek. nach der intravenösen Injektion erfolgt nach einer kurzen Schwankung der Durchblutung der V. cava inferior eine deutliche Minderdurchblutung dieses Gefäßes, ohne daß sich der Blutdruck, eine

geringe Anfangszacke abgesehen, wesentlich verändert. In der gleichen Zeit ist eine sehr deutliche Abnahme der Frequenz zu verzeichnen. Etwa 25 Sek. nach der Injektion beginnt ein erst allmählicher, dann aber rasch zunehmender Anstieg der Durchblutung des rechten Coronargefäßes. Im gleichen Moment ist auch eine leichte Senkung des Vorhofdruckes festzustellen. Wir sehen also, daß durch die Einwirkung des Veratrins der bei diesem Tier schon vorhandene Bezold-Effekt nicht aufgehoben, sondern

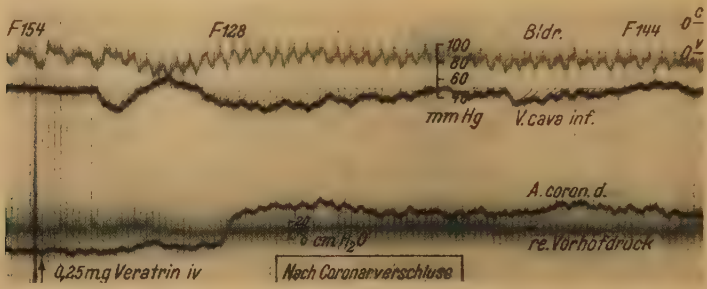


Abb. 9. Hund in Chloralosenarkose: Duchblutung der V. cava inferior und der A. coronaria d. nach Unterbindung der A. coronaria s. Wirkung von 0,5 mg Veratrin.

noch eher weiter vertieft wird, was sich vor allem durch die Verlangsamung der Frequenz und die gleichzeitige Abnahme des Minutenvolumens dokumentiert.

In einzelnen Fällen kommt es nach dem Coronarverschluß bei starker Blutdrucksenkung, d. h. intensivem Bezold-Effekt, durch Veratrin auch zu einem Blutdruckanstieg, wobei allerdings das Minutenvolumen oder der Vorhofdruck unverändert liegt. Wir sehen also, daß bei eingetretenem Bezold-Effekt die sonst regelmäßig beobachtete blutdrucksenkende Wirkung des Veratrins fehlt. Berücksichtigt man außer diesen Befunden die von Dietrich und Schimert festgestellte Tatsache, daß durch das Veratrin stets der gesamte Sauerstoffverbrauch gesenkt wird, ohne daß im Gegensatz zu anderen Kollapsformen eine Sauerstoffschuld im Gewebe entsteht, kann man in der Veratrinwirkung einen günstigen Effekt für das Infarktherz sehen, so daß es gerechtfertigt erscheint, mit dieser Substanz auch vorsichtige therapeutische Versuche zu machen.

Zusammenfassung II. Teil.

Nachdem gezeigt werden konnte, daß bei einem Teil der Herzinfarkte durch reflektorische Umstellung des Kreislaufes zur Schonung des Herzens ein veränderter Reaktionszustand vorliegt, der auf einer Auslösung des Bezold-Jarisch-Effektes beruht, wurden verschiedene bei der Infarktherapie übliche Pharmaka untersucht mit der Frage, ob sich ihre Wirkung in dieser veränderten Reaktionslage des Kreislaufes modifiziert bzw. ob die Reaktionslage verändert wird. Es wird angenommen, daß eine Änderung

bzw. Aufhebung dieser als Schutzvorgang erkannten reflektorischen Kleinerstellung des Kreislaufes auf den Krankheitsprozeß ungünstig einwirkt.

Untersucht wurden Sympatol, Strophanthin, Chinidin, Chinin, Veratrin. Diese Substanzen wurden intravenös Hunden verabreicht, denen 20 Min. vorher durch Unterbindung eines Kranzgefäßes ein Myokardinfarkt gesetzt wurde. Es gelangten die Coronardurchblutung eines anderen Coronargefäßes, die Durchblutung der V. cava inferior oder A. pulmonalis, Durchblutung einer peripheren Arterie sowie der Blutdruck und der Druck im rechten Vorhof zur Aufzeichnung.

1. Periphere Kreislaufmittel (Sympatol) führen zu einer erheblichen Zunahme des Minutenvolumens und damit der vom Herzen zu leistenden Arbeit, die zu einem synchronen Anstieg der Coronardurchblutung führt. Der Blutdruck wird im Kollapszustand nach dem Herzinfarkt nicht wesentlich gesteigert. Dieses periphere Kreislaufmittel kann demnach die reflektorische Kleinerstellung des Kreislaufes aufheben. Seine therapeutische Anwendung ist daher zumindest im Kollapszustand des akuten Herzinfarktes zu überlegen.

2. Strophanthin. K-Strophanthin β führt zu einem außerordentlich günstigen Effekt. Starke Zunahme der Coronardurchblutung, die nur in diesem veränderten Reaktionszustand in gleichem Maße beobachtet werden kann, bei gleichzeitig geringer Abnahme des Minutenvolumens und allmählicher geringer Steigerung des Blutdruckes. Zum Zeichen der günstigen Wirkung auf die Leistungsfähigkeit des Herzens nimmt der Vorhofdruck ab. Die reflektorische Entlastung des Kreislaufes wird demnach durch dieses Herzglykosid nicht aufgehoben, sondern gefördert. Es wird auf die ebenfalls günstige energetische Wirkung des Strophanthins hingewiesen.

3. Durch Chinin bzw. Chinidin erfolgt keine Veränderung der reflektorischen Kreislaufumstellung. Vorhandene Arrhythmien werden unter Zunahme der Coronardurchblutung und Abnahme des Vorhofdruckes beseitigt. Eine schädigende Wirkung auf das Infarktherz ist nicht nachzuweisen. Damit ist ein Beweis dafür erbracht, daß die kombinierte Chinidin-Strophanthintherapie die Gefahren des akuten Herztodes vermindert.

4. Das Veratrin führt zu einer Zunahme der Coronardurchblutung unter Senkung des Minutenvolumens. Im schweren Kollapszustand ist durch das Veratrin entgegengesetzt der sonstigen Wirkung eine Zunahme des Blutdruckes zu beobachten. Zum Zeichen des günstigen Veratrineffektes, der vermutlich auf einer Verbesserung der reflektorischen Umstellung des Kreislaufes beruht, nimmt der Vorhofdruck ab.

Literatur.

Amann u. Schaefer: Pflügers Arch. **246**, 757 (1943). — Naunyn-Schmiedebergs Arch. **201**, 43 (1943). — Aschenbrenner u. Codas, Thompson: Z. klin. Med. **133**, 483 (1937). — Benzinger: Handbuch der inneren Medizin, Bd. VI, S. 966. 1941. Bergmann, G. v.: Funktionelle Pathologie, 2. Aufl. Berlin: Springer 1936. — Münch.

med. Wschr. **1919 I**, 705. — Dtsch. med. Wschr. **1934 I**, 37. — Bezold, v. u. Hirth: Untersuchungen aus dem Physiologischen Laboratorium in Würzburg, **1**, 95 (1867). — Blumberger: Med. Klin. **1938**, 12, 397. — Boecke; Zit. nach Stöhr jr. — Bohnenkamp: Lehrbuch der speziellen Pathologie. Jena 1937. — Büchner, F.: Coronarinsuffizienz, Sammlung Kreislaufbücherei, Bd. 3. 1939. — Zbl. Path. **63**, Erg.-H. 3, 188 (1935). — Condorelli: Die Ernährung des Herzens und die Folgen ihrer Störung. Dresden-Leipzig 1932. — Coelho: L'infarctus du Myocarde. Paris 1939. — Dietrich, S.: Z. exper. Med. **91**, 689 (1933). — Dietrich, S. u. G. Schimert jun.: Verh. dtsch. Ges. Kreisl.forsch. **13**, 131 (1940). — Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **1939**. — Dietrich, S. u. H. Schwiegk: Z. klin. Med. **125**, 295 (1933). — Donath: Wien. klin. Wschr. **1936 I**, 22. — Edens: Digitalisbehandlung. Berlin: Urban & Schwarzenberg 1934. — Münch. med. Wschr. **1935 II**, 670. — Z. Kreisl.forsch. **31**, 177 (1939). — Klin. Wschr. **1943**, 4, 69. — Fishberg, Hitzig and King: Arch. int. Med. (Am.) **54**, 997 (1934). — Fraenkel: Münch. med. Wschr. **1904 II**, 1272. — Strophanthintherapie. Berlin: Springer 1933. — Frey: Berl. klin. Wschr. **1918**, Nr 18, 19, 36. — Gallavardin: Ann. Med. (Am.) **20**, 161 (1926). — Gollwitzer-Meier u. Kroetz: Klin. Wschr. **1940**, Nr 24/45, 580, 616. — Gollwitzer-Meier u. Krüeger: Pflügers Arch. **283**, 3 (1936). — Gotsch: Z. klin. Med. **1932**, 631 (1937). — Verh. dtsch. Ges. Kreisl.-forsch. **10**, 209 (1937). — Gremels: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **182**, 1 (1936); **186**, 625 (1937). — Hauss, Tietze u. Falk: Z. Kreisl.forsch. **34**, 335 (1942). — Hausner u. Scherf: Z. klin. Med. **126**, 177 (1933). — Hess, W. R.: Regulierung des Blutkreislaufs. Leipzig 1930. — Henze u. Jarisch: Zit. nach Jarisch. — Hildebrand: Arch. Kreisl.forsch. 8, 137 (1941). — Hochrein: Verh. dtscb. Ges. inn. Med. **1931**, 291. — Klin. Wschr. **1931**, 690. — Der Myokardinfarkt, 2. Aufl. Dresden: Theodor Steinkopff 1941. — Herzkrankheiten, Bd. I. Dresden u. Leipzig 1941; Bd. II. 1943. — Der Coronarkreislauf. Berlin 1943. — Siehe bei Hochrein weitere erschöpfende Literaturzusammenstellung. — Jagić u. Zimmermann: Münch. med. Wschr. **1935 I/II**, 641, 1633. — Jarisch: Klin. Wschr. **1941 II**, 1045. — Naunyn-Schmiedebergs Arch. **197**, 266 (1941). — Arch. Kreisl.forsch. **9**, 1 (1941). — Z. Kreisl.forsch. **276** (1941). — Jarisch u. Richter: Klin. Wschr. **1939 I**, 185. — Klostermeyer u. Johnson: Klin. Wschr. **1937 II**, 1724. — Korth, Marx u. Weinberg: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **185**, 42 (1937). — Kroetz: Arch. Kreisl.forsch. **10**, 6/7 (1942). — Lewine: Médicine **1929**, 253. — Master, Jaffé and Dack: Amer. Heart J. **12**, 549 (1936). — McDovall: J. Physiol. (Brit.) **59**, 41, 36 (1924); 81, 5 (1934). — Meyer u. Spiegelhoff: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **187**, 65 (1937). — Morawitz u. Hochrein: Münch. med. Wschr. **1929 I**, 175. — Oettel, Hansjürgen: Erg. inn. Med. **63**, 418 (1943). — Oettel, Hansjürgen u. G. Schimert jr.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. (im Druck). Orias: Amer. J. Physiol. **101**, 81 (1932). — Osterwald: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **190**, 535 (1938). — Z. Kreisl.forsch. **31**, 215 (1939). — Pannier: Arch. internat. Pharmacodynam. **64**, 476 (1940). — Pardee: Arch. int. Med. (Am.) **26**, 244 (1920); **31**, 2 (1927). — Amer. Heart J. **191** (1929). — Parkinson and Bedford: Lancet **1928**, 4—10. — Porter: Z. Physiol. **1855**, 481. — J. exper. med. (Am.) **1**, 46 (1886). — Rein: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **1931**, 247. — Richter u. Schröcksnadel: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **191**, 23 (1939). — Rössler: Zit. nach Osterwald. — Rubino: Fol. med. (It.) **1937**, 21. — Rühl: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **164**, 5/6 (1932); **192**, 109 (1939). — Klin. Wschr. **11**, 247 (1932). — Verh. dtsch. Ges. inn. Med., Wiesbaden **1933**. — Rühl u. Wiehler: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **175**, 4/6 (1934). Sauerbruch: Dtsch. Z. Chir. **255**, 152 (1941). — Sarkady: Klin. Wschr. **1943**, Nr 5, 103. — Scheuer: Erg. inn. Med. **59**, 753. — Scheuer u. Hugo: Münch. med. Wschr. **1942**, 43, 907. — Scherf: Z. klin. Med. **120**, 715 (1923). — Schimert, J.: Z. Zellforsch. **27**, 246 (1937). — Schimert, G. sen.: Allg. homöop. Ztg **1937**. — Schimert, G. jr.: Klin. Wschr. **1943**, 26/27. — Unveröffentlichte Versuche. — Stöhr jr.: Handbuch der mikroskopischen Anatomie, Bd. 4, S. 202. 1928. — Travell, Gold and Modell: Arch. int. Med. (Am.) **61**, 184 (1938). — Wezler: Pflügers Arch. **1940**.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Hamburg.
Direktor: Professor Dr. E. Keeser.

Untersuchungen über Thromboseprophylaxe mit organischen Salzen seltener Erden*.

III. Mitteilung.

Die thromboseverhütende Wirkung des Neodymnicotinats.

Von

Erich Vincke.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. November 1946.)

In den beiden vorhergehenden Mitteilungen[1, 2] war gezeigt worden, daß unter zahlreichen untersuchten organischen Salzen seltener Erden die Salze des Praseodyms und des Neodyms mit Nicotinsäure bei starker blutgerinnungshemmender Wirkung eine sehr geringe Giftigkeit besitzen. Bevor eines dieser Nicotinate oder ein ähnlich zusammengesetztes Salz seltener Erden als Thromboseprophylaktikum empfohlen werden kann, muß noch der Beweis erbracht werden, daß sie auch tatsächlich imstande sind, die Entstehung von Thrombosen zu verhindern. Die Ergebnisse derartiger Untersuchungen sollen im Folgenden mitgeteilt werden.

Für die experimentelle Erzeugung von Thrombosen sind verschiedene Methoden angegeben worden. So hat man empfohlen, die innere Venenwand durch chemische Mittel (z. B. Jodtinktur, Natriumricinolat) zu ätzen, mechanisch (durch Zerquetschen) zu schädigen, Thrombin oder Muskelpreßsaft zu injizieren, Reaktionen des Gefäßendothels durch Bakterientoxine hervorzurufen oder extravasal Thromben zu erzeugen. Bei der Prüfung von Mitteln hinsichtlich der Eignung zur Thromboseprophylaxe muß unseres Erachtens das Ziel sein, Thromben zu erhalten, die nach ihrer Entstehung und nach ihrem Aufbau den bei der menschlichen Fernthrombose vorhandenen möglichst weitgehend ähneln, d. h. also, Abscheidungs- oder gemischte Thromben zu erzeugen und nicht nur durch Injektion von Thrombin oder Muskelpreßsaft eine plötzlich einsetzende überstürzte intravasale Blutgerinnung. Infolgedessen wählten

* Die vorliegende Arbeit wurde am 27. März 1944 bei der Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin eingereicht; sie ist aber dort nicht mehr erschienen.

[1] Z. exper. Med., I. Mitt. 113, 522 (1944). — [2] Z. exper. Med., II. Mitt. 113, 536 (1944).

wir für unsere Versuche die zwei nachstehend angegebenen Methoden, die uns die größte Gewähr dafür zu bieten schienen, diese Bedingungen experimentell weitgehend zu erfüllen. Alle Versuche wurden mit Neodymnikotinat angestellt.

Zuerst wurden einige Versuche mit der von ROWNTREE und SHIONOYA entwickelten Methode ausgeführt, mittels welcher z. B. auch BEST und Mitarbeiter den Einfluß des Heparins auf die Bildung weißer Thromben an einer großen Reihe von Tieren prüften. Bei dieser Methode wird die extravasale Gerinnung in passend gebogenen Glas- (Kollodium-, Cellophan-)Röhrchen untersucht, die eine Anastomose von Arterie und Vene durchzuführen gestatten. Die von uns angewandte Methodik war dieselbe, wie sie von BEST und Mitarbeitern angegeben wurde.

Als Versuchstiere wurden Hunde in Morphin-Pernocton-Narkose verwendet. Die U-förmig gebogenen Glasröhrchen von 4 mm lichter Weite und passender Länge (etwa 15 cm) verbanden Carotis und Jugularis[3]. Die Neodymnicotinatlösung wurde als 0,2%ige Lösung in physiologischer Kochsalzlösung in die Jugularis durch die Glaskanüle einlaufen lassen, bevor die Verbindung mit der Carotis erfolgte[4]. Die Kontrolle des histologischen Aufbaues etwa gebildeter Thromben erfolgte bei allen Versuchen dieser Arbeit im hiesigen Pathologischen Institut, wofür wir Herrn Professor FAHR verbindlichst danken.

Der Verlauf eines Versuches geht am besten aus dem folgenden Versuchsprotokoll hervor (Tabelle 1).

Tabelle 1. *Hund*, ♀, 12,0 kg.

11^{18}	Beginn des Blutdurchlaufs durch das erste Glasrohr.
12^{06}	1. Glasrohr entfernt. Befund:3 Thromben von 3, 3 und 6 cm Länge. Histologischer Befund: Abscheidungsthrombose.
12^{15}	2. Glasrohr in Jugularvene eingebunden.
12^{19}—12^{39}	Infusion von 20 mg Neodymnicotinat/kg Körpergewicht (als 0,2%ige Lösung).
12^{40}	2. Glasrohr in Carotis eingebunden. Beginn des Blutdurchlaufs.
14^{10}	Ende des Versuches. Befund: Blut im Glasrohr völlig flüssig. Keinerlei Thrombenbildung.

Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Die gebildeten Thromben erwiesen sich nach ihrem Aufbau überwiegend als typische Abscheidungsthromben. Ein Beispiel hierfür gibt Abb. 1 (Tabelle 2, Versuch 3) wieder. Aus Tabelle 2 ergibt sich, daß Dosen von 35—40 mg Neodymnicotinat/kg bei der angewandten Methode praktisch stets imstande sind, die Entstehung von Thromben zu verhindern. Bei der Infusion von 20 mg Neodymnicotinat (Versuch 6 und 7) kam es nur

[3] Zuerst verwandten wir U-förmige, an den Enden sich verjüngende Glasrohre von 9 mm lichter Weite und 10 cm Länge, die in der Mitte durch einen Glasschliff auseinander genommen werden konnten. Es zeigte sich aber sehr bald, daß die bequemer zu handhabenden aus einem Stück bestehenden Glasröhrchen von 4 mm Weite ihren Zweck völlig erfüllten. — [4] Für seine Hilfe bei diesen Versuchen sind wir Herrn Dr. med. habil. H. E. NEVER zu Dank verpflichtet.

Tabelle 2.

Versuchsnummer	Gewicht des Hundes in Kilogramm	mg Neodymnicotinat/kg Körpergewicht i.v.	Blutdurchlaufzeit in Min. vor Infusion des Neodymnicotinats	Blutdurchlaufzeit in Min. nach Infusion des Neodymnicotinats	Befund	Histologischer Befund
1	20,0		90	—	Thrombus	Typischer Abscheidungsthrombus, Plättchenthrombus
		40,0	—	43	Blut völlig flüssig	—
2	30,0		32	—	Thrombus	Abscheidungsthrombus
		33,3	—	66	Blut völlig flüssig	—
3	11,0		139	—	6 cm langer Thrombus	Abscheidungsthrombus
		35,0	—	107	2 sehr kleine Thromben	Abscheidungsthrombus
			—	19h	1 sehr kleiner Thrombus, Blut sonst völlig flüssig	Abscheidungsthrombus
4	20,0		170	—	Erbsengroßer Thrombus	Abscheidungsthrombus
		40,0	—	80	Blut völlig flüssig	—
			—	6h	Blut völlig flüssig	—
5	5,5		162	—	12 cm langer Thrombus	Abscheidungsthrombus
		40,0	—	175	Blut völlig flüssig	—
6	9,3		71	—	20 cm langer Thrombus	Abscheidungsthrombus
		20,0	—	100	3 winzige Gerinnsel	Abscheidungsthrombus
7	12,0		48	—	3 Thromben von 3, 3 und 6 cm Länge	Abscheidungsthrombose
		20,0	—	90	Blut völlig flüssig	—
8	10,0		45	—	15 cm langer Thrombus	—
		10,0	—	102	15 cm langer Thrombus	—
9	10,0		45	—[5]	12 cm langer Thrombus	Abscheidungsthrombus
		4 mg „Parathrodym"	—	99[5]	15 cm langer Thrombus	—
			55	—[5]	10 cm langer Thrombus	Abscheidungsthrombus
		10,0	—	90	2 kleine Gerinnsel, Blut sonst völlig flüssig	Abscheidungsthrombus

[5] Blutgerinnungszeit bei 25°: 5—6 Min.

Tabelle 2. (Fortsetzung.)

Versuchsnummer	Gewicht des Hundes in Kilogramm	mg Neodymnicotinat/kg Körpergewicht i. v.	Blutdurchlaufszeit in Min. vor Infusion des Neodymnicotinats	Blutdurchlaufszeit in Min. nach Infusion des Neodymnicotinats	Befund	Histologischer Befund
10	6,7		67	—[6]	15 cm langer Thrombus	Abscheidungsthrombose
		4 mg „Parathrodym"	—	67[6]	12 cm langer Thrombus	Abscheidungsthrombose
			58	—	12 cm langer Thrombus	Abscheidungsthrombose
		10,0	—	55[7]	12 cm langer Thrombus	Beginnende Abscheidungsthrombose

einmal zur Bildung von winzigen Gerinnseln, dagegen reichte eine Dosis von 10 mg/kg nicht mehr aus, um mit Sicherheit die Bildung von Thromben zu verhüten (Versuch 8—10). Bemerkenswert erscheint der Befund, daß das Präparat „Parathrodym" in Dosen von 4 mg/kg (0,2%ige Lösung) nicht die Bildung von Thromben zu verhüten vermag, obwohl diese Dosis von DYCKERHOFF und Mitarbeitern zur Thromboseprophylaxe beim Menschen empfohlen wird. Auch die Blutgerinnungszeit blieb durch diese Dosis völlig unbeeinflußt (s. Tabelle 2, Fußnoten).

Wie erwähnt, kam es uns darauf an, Blutpfröpfe zu erzeugen, die den menschlichen Spontanthromben möglichst weitgehend ähneln. Hierfür schien uns außer der ersten von uns angewandten Methode eine von DIETRICH angegebene Versuchsanordnung geeignet[8]. Bei ihr wird an Kaninchen durch Sensibilisierung mit Colibazillen und nachfolgender Injektion mit Bazillenfiltraten bei gleichzeitiger leichter Venenstauung eine Thrombosierung der Vena jugularis hervorgerufen.

DIETRICH wies nach, daß bei der Bildung dieser Thromben neben der durch Stauung veränderten Blutströmung eine Fibrinabscheidung eine Rolle spielt. Er glaubt, daß es sich dabei um eine Reaktion der durch Colitoxine sensibilisierten Endothelien handelt. Nach DIETRICH ist also neben der Strömungsveränderung des Blutes ein reaktiver Vorgang an der Gefäßwand — z. B. durch die Anwendung von Colitoxinen hervorgerufen — eine wesentliche Bedingung für die Thrombenbildung.

Diese Thrombosen sind im Gegensatz zu aseptischen postoperativen Thrombosen des Menschen auf infektiöser Basis entstanden, und es erhebt

[6] Blutgerinnungszeit bei 25°: 2—3 Min. — [7] Blutgerinnungszeit bei 25°: 4 bis 6 Min. — [8] Wir sind Herrn Professor DIETRICH für die Bereitwilligkeit, mit der er uns über manche Einzelheiten seiner Methode Auskunft erteilte, zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

sich deshalb die Frage, ob sie mit diesen vergleichbar sind. Nach DIETRICH werden mit seiner Methode Thromben erhalten, die eine Ähnlichkeit mit menschlichen Spontanthromben haben, wie sie noch bei keiner anderen Versuchsanordnung erzielt wurde. Auf Grund dieser Überlegungen glaubten wir uns berechtigt, die DIETRICHsche Methode als weiteren Test für die Wirkung des Neodymnicotinats auf die Thrombenbildung zu verwenden[9].

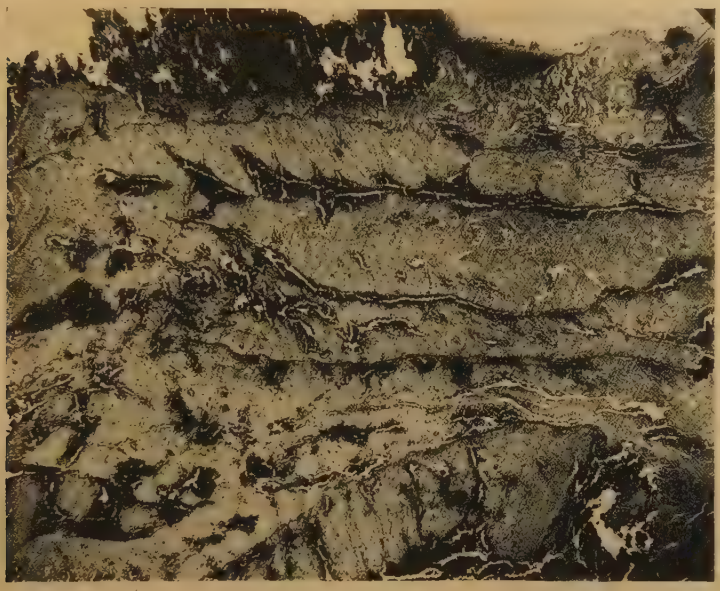


Abb. 1. Abscheidungsthrombus (Vergr. 12mal).

Die Versuchsanordnung war hierbei folgende:

Bei Kaninchen wurde in Äthernarkose eine Vena jugularis freigelegt und ein Muskel-Faszienstreifen so unter ihr hindurchgezogen, daß eine mittelgradige Stauung mit deutlich sichtbarem Abfluß entstand. Nach der Operation wurde in die seitengleiche Ohrvene 1 ccm einer Coliaufschwemmung (1 Öse einer 24stündigen Agarkultur auf 10 ccm physiologische Kochsalzlösung) injiziert; 24 und 48 Stunden später wurde 1 ccm eines Colifiltrates des gleichen Stammes (1 Öse einer 24stündigen Agarkultur auf 10 ccm physiologische Kochsalzlösung durch Seitzfilter filtriert) in die andere Ohrvene injiziert. Nach 72 Stunden wurde das Tier getötet oder die Wunde beim lebenden Tier geöffnet und die Vene reseziert.

Wie sich bei diesen Versuchen zeigte, kam es sehr auf den Grad der Venenstauung an. Zunächst befürchteten wir, daß die Stauung nicht im gleichen Maße erhalten bliebe oder gar verloren ginge, wenn das Tier nach der Operation wieder normale Lage einnahm. Wir prüften dementsprechend, ob das Bestehenbleiben einer wirksamen Stauung von der Art der Unterführung der Drosselungsschlinge abhing und legten deshalb bei einem Teil der Versuche die Stauung so an, daß wir den Faszien-

[9] Vgl. hierzu auch E. SCHARPFF: Diss. Hamburg, 1944. Wir danken Fräulein SCHARPFF herzlich für die Ausführung der mühevollen Untersuchungen.

streifen spiralig um die Vene schlangen und ihn oberhalb der Stauungsstelle in der Halsmuskulatur befestigten. Beim größeren Teil der Versuche führten wir jedoch den Streifen unter der Vene hindurch und bogen ihn zu seiner Wurzel zurück. Es wurde gefunden, daß beide Unterbindungsarten gleich wirksam waren und daß es darauf ankam, den notwendigen Stauungsgrad zu treffen: eine zu schwache Stauung verhindert das Entstehen einer Thrombose, wie sich bei einer Reihe von Fehlschlägen zeigte. Nachdem wir dann bei der Verwendung des gleichen Colistammes etwas stärker drosselten, erhielten wir prompt Thrombenbildung.

Bei dieser Art des Vorgehens war natürlich zu bedenken, daß diese Thromben eventuell im Sinne von Stagnationsthromben, also durch vollkommenen Verschluß des Gefäßes, entstanden sein konnten. Um zu zeigen, daß die in unseren Versuchen verwandte Stauung allein zur Bildung solcher Thromben nicht genügte, führten wir eine Reihe von aseptischen Kontrollversuchen durch, in denen wir zwar gleich stark stauten, aber eine Colibehandlung unterließen. Nur in 2 von 8 derartigen Versuchen erhielten wir oberhalb der Drosselungsstelle feste Gebilde; diese erwiesen sich jedoch nicht als echte Thromben, sondern waren makroskopisch bzw. mikroskopisch als einfaches Gerinnsel zu erkennen.

Im Verlauf der Untersuchungen zeigte sich, daß nicht jeder Colistamm thrombosefördernd wirkt, bzw. diese Eigenschaft sogar verlieren kann. Der erste von uns verwandte Stamm (Coli I) verlor so z. B. mit der Zeit aus unbekannten Gründen seine thrombosefördernde Eigenschaft. Seine plötzlich auftretende Toxizität bewies ebenfalls, daß mit dem Stamm eine Veränderung vorgegangen war: die Versuchstiere starben nach seiner Applikation bereits vor Ablauf der üblichen Versuchszeit. Nach vielen vergeblichen Versuchen mit Stämmen, welche die Tiere entweder töteten oder welche nicht sicher thrombosefördernd wirkten, fanden wir endlich einen brauchbaren Stamm Nr. VI.

Insgesamt wurden 88 Thromboseversuche angestellt. Die erhaltenen Thromben waren teils mehr Gerinnungs- und teils mehr Abscheidungsthromben. In den meisten Fällen traten beide Formen nebeneinander auf. Das mikroskopische Bild zeigte einen wirbelig aufgebauten Thrombus mit Erythrocytenkonglutination und Abscheidungen weißer Blutelemente (Abb. 2). In der Umgebung der Gefäßwände fanden sich gelegentlich Rundzelleninfiltrate. In mehreren Versuchen warer die Thromben schwer von der Gefäßwand zu lösen; sie hatten also schon makroskopisch Gefäßwandbeziehungen. Auch im histologischen Bild war oft die Grenze zwischen Thrombus und Venenwand nicht deutlich; die letztere zeigte Endothelauflockerung und Intimaproliferation. In anderen Fällen erhielten wir glatte Blutpfröpfe, die sich im Blutstrom bewegten; diese waren meist weiß gefleckt und gezeichnet. Hier verursachten wahrscheinlich in der Hauptsache die veränderten Strömungsverhältnisse die Thrombenbildung.

Mit Colistamm I stellten wir 11 Kontrollversuche an. Bei 8 Tieren konnten wir eine Thrombose erzielen; bei den 3 Tieren, die keine Thrombose aufwiesen, war versuchsweise nur schwach gestaut worden. Colistamm VI war nicht so zuverlässig thrombosefördernd wie Stamm I. Immerhin erhielten wir auch bei ihm in 15 Kontrollversuchen zwölfmal eine Thrombose. Dreimal entstanden trotz ausreichender Stauung keine Thromben. Die mit diesem Stamm erhaltenen Thromben unterschieden

sich meist von den mit Stamm I erhaltenen durch ihre glatte Oberfläche und ihre mangelnde Wandbeziehung. Sie waren aber an ihrer festen Konsistenz als sicher intravital entstandene Pfröpfe erkennbar. Histologisch zeigten sie wie die mit Stamm I erhaltenen meistens den Bau eines gemischten Thrombus.

Wir stellten nun Versuche über den Einfluß verschiedener blutgerinnungshemmender Substanzen auf die Thrombosebildung an. Um den

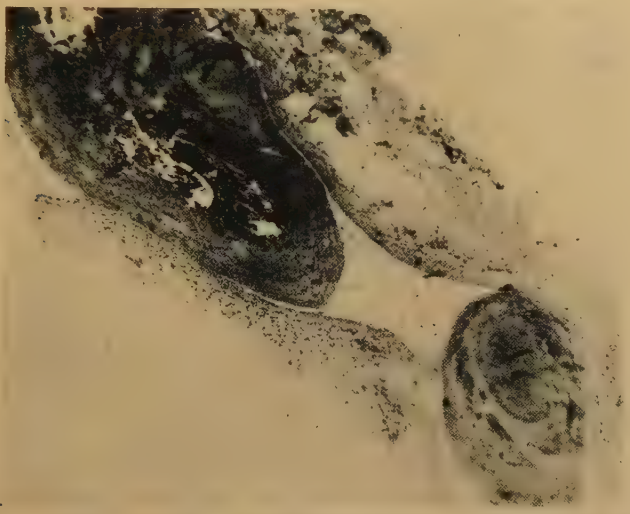


Abb. 2. Wirbelig gebauter Konglutinationsthrombus mit streifenförmigen Leukozytenabscheidungen.

Einwand zu entkräften, daß die thrombosefördernde Eigenschaft der Colistämme bei diesen Versuchen anders gewesen sein könnte als bei den Kontrollversuchen, betonen wir, daß die Kontrollen nicht als Vorversuche, sondern als Parallelversuche durchgeführt wurden: in einer Versuchsreihe wurden jeweils mehrere Kontrolltiere mit der gleichen Bakterienaufschwemmung und mit dem gleichen Filtrat wie die eigentlichen Versuchstiere behandelt. Von blutgerinnungshemmenden Substanzen wurden Heparin[10] und Neodymnicotinat untersucht.

Die Zufuhr der zu prüfenden Substanz geschah durch Injektion ihrer Lösung (in physiologischer Kochsalzlösung) in die Ohrvene der nicht behandelten Seite, und zwar erstmalig unmittelbar nach der Operation und der Injektion der Bakteriensuspension, von da ab im Abstand von je 8 Stunden beim Heparin, bzw. 12 Stunden beim Neodymnicotinat. Das Heparin wurde als $^1/_2$—1%ige und das Neodymnicotinat als 0,2%ige Lösung appliziert.

8 Tiere wurden mit Heparin behandelt; dabei erhielten 2 Tiere unmittelbar nach der Operation sowie neben der Colifiltratinjektion 3 Tage lang täglich 40 mg und

[10] Als Heparinpräparat wurde das „Vetren" (Chem. Fabr. Promonta GmbH., Hbg.) verwendet.

Tabelle 3. *Versuche mit Heparin.*
Kaninchen in Äthernarkose. Drosselung der Vena jugularis durch rückläufigen Faszienstreifen. Aufnahme des Lokalbefundes am 4. Tag.

Versuchsnummer	Gewicht des Tieres in Kilogramm	Grad der Stauung nach Unterführung der Schlinge	mg Heparin/kg Körpergewicht und Tag	Befund an der Drosselungsstelle
1	2,3	gut	2mal 15 mg, 1mal 10 mg	am 2. Tag gestorben
2	2,0	gut	2mal 15 mg, 1mal 10 mg	kein Thrombus
3	2,2	gut	2mal 10 mg, 1mal 5 mg	am 3. Tag gestorben
4	1,5	gut	2mal 10 mg, 1mal 5 mg	Tier moribund, glattes Cruorgerinnsel
5	2,9	schwach	2mal 10 mg, 1mal 5 mg	am 2. Tag gestorben
6	2,8	mäßig	2mal 10 mg, 1mal 5 mg	kein Thrombus
7	2,4	gut	2mal 10 mg, 1mal 5 mg	am 3. Tag gestorben
8	2,5	—	2mal 10 mg, 1mal 5 mg	kein Thrombus

6 Tiere 25 mg/kg Körpergewicht (morgens und abends je 10 bzw. 15 mg/kg, mittags 5 bzw. 10 mg/kg).

Die Versuche mit Heparin sind in Tabelle 3 dargestellt. Von den 8 Tieren starben 4 vor dem Ende der Sensibilisierungszeit, meist unter Krämpfen. Bei der Sektion fanden sich in den meisten Fällen punktförmige Blutungen im Endo- und Epikard, in Darm und Muskeln. Daneben fanden sich stark gestaute Organe und in einem Falle (Nr. 1) Lungenblähung. Wir nehmen an, daß der Tod der Tiere auf eine allergische Reaktion aus ungeklärter Ursache zurückzuführen ist. Bei den vier übrigen Tieren fand sich nach Versuchsabschluß kein Thrombus. Ein Gerinnsel, das sich bei dem moribunden Tier Nr. 4 aus der Vene ziehen ließ, war sicher ein bloßes Cruorgerinnsel.

In den Versuchen mit Neodymnicotinat erhielten die Tiere zweimal 15 mg Neodymnicotinat/kg Körpergewicht bzw. zweimal 15 mg und einmal 10 mg Neodymnicotinat/kg Körpergewicht täglich injiziert.

Die Befunde sind in Tabelle 4 wiedergegeben. In den Versuchen 1 bis 6 benutzten wir Colistamm I zur Sensibilisierung. Bei dreien von den vier ersten Versuchstieren wurde durch die Applikation des Neodymnicotinats das Entstehen einer Thrombose verhindert, bei dem vierten Tier entstand ein typischer gemischter Thrombus. Ob dieser letzte Befund mit den physiologischen Eigenschaften des verwandten Colistammes[11] oder mit der gewählten Dosierung des Neodymnicotinats

[11] Unseres Erachtens ist es nicht ausgeschlossen, daß durch die Steigerung der Toxizität des Colistammes I und die dadurch gesetzte Kreislaufschädigung die Auslösung einer Thrombose begünstigt wurde.

Tabelle 4. *Versuche mit Neodymnicotinat.*
Kaninchen in Äthernarkose. Drosselung der Vena jugularis durch rückläufigen Faszienstreifen. Sensibilisierung der Tiere mit Colistamm I von Versuchsnummer 1—6, mit Colistamm VI von Versuchsnummer 7—14. Aufnahme des Lokalbefundes am 4. Tag.

Versuchsnummer	Gewicht des Tieres in Kilogramm	Grad der Stauung nach Unterführung	mg Neodymnicotinat/kg Körpergewicht und Tag	Befund an der Drosselungsstelle
1	1,6	gut	2mal 15 mg	kein Thrombus
2	1,5	gut	2mal 15 mg	kein Thrombus
3	1,3	gut	2mal 15 mg, 1mal 10 mg	kein Thrombus
4	1,3	gut	2mal 15 mg, 1mal 10 mg	1,2 cm langer gemischter Thrombus
5	1,7	gut	2mal 15 mg, 1mal 10 mg	am 2. Tag gestorben
6	1,2	gut	2mal 15 mg, 1mal 10 mg	am 2. Tag gestorben
7	1,5	gut	2mal 15 mg	kein Thrombus, histolog.: Intimaproliferation
8	1,6	gut	2mal 15 mg	kein Thrombus
9	1,7	gut	2mal 15 mg	am 4. Tag gestorben, Leichengerinnsel
10	1,5	gut	2mal 15 mg	am 3. Tag gestorben
11	1,6	gut	2mal 15 mg	kein Thrombus
12	2,0	gut	2mal 15 mg	kein Thrombus
13	1,8	gut	2mal 15 mg	kein Thrombus
14	1,5	gut	2mal 15 mg	kein Thrombus

zusammenhängt, konnten wir leider nicht durch weitere Versuche klären, da wir Stamm I nicht länger verwenden konnten: er wurde, wie erwähnt, plötzlich aus unbekannten Gründen so toxisch, daß die nächsten Versuchstiere (5 und 6) und fast alle später verwendeten Kontrolltiere vor Ende des Versuches starben.

Die Fortsetzung der Versuche erfolgte dann mit Colistamm VI (Versuch 7—14). Von den acht zweimal täglich mit 15 mg Neodymnicotinat/kg Körpergewicht behandelten Tieren starben zwei vor Ende des Versuches, davon eines am vierten Versuchstag. Dieses Tier kann daher noch für die Auswertung herangezogen werden. Bei sämtlichen Tieren enthielt die Vene oberhalb der Drosselungsstelle entweder nur flüssiges Blut, oder (bei dem gestorbenen Tier) typische weiche Leichengerinnsel. Auf der Intima der Vene des Tieres Nr. 7 sah man makroskopisch eine kleine rauhe Stelle; mikroskopisch zeigte sich hier eine Intimaproliferation ohne anhaftende Blutbestandteile. Wir erwähnen diesen Befund, weil er zeigt, daß die gewünschte Sensibilisierung zustande gekommen war und daß trotz der Intimaveränderungen nach Zufuhr von Neodymnicotinat keine Thrombose entstand.

Tabelle 5.

Versuchsnummer	Gewicht des Kaninchens in Kilogramm	Verbindung	Zahl der Injektionen von 10 mg der Verbindung/kg Körpergewicht	Zeitpunkt der Tötung der Versuchstiere	Histologischer Befund
1	2,0	Praseodym-nicotinat	13	sofort	Starke Speicherung in der Milzpulpa, geringere in den Sternzellen der Leber. Starke Aufhellung der Leberepithelien, zahlreiche Granulome in der Leber mit Eosinophilie; stellenweise zentrale Nekrosen, in der Niere keine nennenswerten Veränderungen.
2	2,6	Praseodym-nicotinat	6	sofort	Sehr starke Speicherungsvorgänge an großen Pulpazellen in der Milz, etwas weniger in der Leber, Rundzelleninfiltrate an der GLISSONschen Kapsel. Niere ohne nennenswerte Veränderungen.
3	2,2	Neodym-nicotinat	14	sofort	Großtropfige Verfettung der Leber, starke Speicherung in den Retikuloendothelien der Milz, Schwellung der Epithelien in den Hauptstücken der Niere.
4	2,1	Neodym-nicotinat	14	sofort	Speicherung in den Retikuloendothelien der Milz. Diffuse Aufhellung der Leberzellen, Schwellung an den Hauptstücken der Niere.
5	2,3	Neodym-nicotinat	14	14 Tage nach Versuchsende	Speicherungen in der Milz, wabige Aufhellung der Leberzellen, Niere ohne Befund.
6	2,5	Neodym-nicotinat	14	14 Tage nach Versuchsende	Speicherungen in der Milzpulpa. Vakuolige Aufhellungen der Leberzellen und geringfügige Infiltrate an der GLISSONschen Kapsel. Niere ohne nennenswerte Veränderungen.
7	2,3	Neodym-nicotinat	14	4 Wochen nach Versuchsende	Speicherungsvorgänge in der Milzpulpa. Niere ohne Befund. An der Leber kleine Infiltrate an der GLISSONschen Kapsel.
8	2,1	Neodym-nicotinat	14	4 Wochen nach Versuchsende	Speicherungen in der Milzpulpa und in den KUPFFERschen Sternzellen der Leber. Aufhellungen der Leberzellen. Niere ohne Befund.

Tabelle 5. (Fortsetzung.)

Versuchsnummer	Gewicht des Kaninchens in Kilogramm	Verbindung	Zahl der Injektionen von 10 mg der Verbindung/kg Körpergewicht	Zeitpunkt der Tötung der Versuchstiere	Histologischer Befund
9	2,8	Samarium-nicotinat	13	sofort	Speicherung in der Milzpulpa und in den Sternzellen der Leber. Beginnende Sklerosierung der Milzpulpa. Leichte Aufhellung der Leberepithelien, kleine Granulome an der GLISSONschen Kapsel, an der Niere nichts besonderes.

Die thromboseverhütende Wirkung des Neodymnicotinats ließ es angebracht erscheinen, Versuche über das Schicksal dieser Verbindung im Organismus auszuführen Hierbei interessierte uns besonders der Ablauf von etwa auftretenden anatomischen Veränderungen nach Beendigung der Zufuhr und dabei insbesondere, ob sich diese Veränderungen wieder zurückbildeten.

Die Versuche wurden an erwachsenen Kaninchen im Gewicht von 2—2,8 kg ausgeführt. Die Tiere erhielten täglich 10 mg Neodymnicotinat/kg (bzw. in zwei Versuchen 10 mg Praseodymnicotinat und in einem Versuch 10 mg Samariumnicotinat/kg) Körpergewicht als 0,2%ige Lösung intravenös injiziert. Nach Abschluß der Behandlung wurde ein Teil der Tiere sofort getötet. Um zu entscheiden, ob eine Regeneration etwa geschädigter Organe innerhalb kurzer Zeit eintrat, wurden außerdem 2 der 6 Tiere, die Neodymnicotinat erhalten hatten, 14 Tage und 2 dieser Tiere 4 Wochen nach der letzten Injektion getötet (Tabelle 5).

Nach 8- bzw. 14tägiger Zufuhr der Verbindungen zeigten sich histologisch an der Niere keine wesentlichen Änderungen, abgesehen von den geschwollenen Hauptstücken. Ebenso wurden an der Milz außer den Speicherungsvorgängen in keinem Falle sekundäre Veränderungen beobachtet. An der Leber ist außer den Speicherungsvorgängen in den KUPFFERschen Sternzellen eine vakuolige Aufhellung der Leberzellen hervorzuheben, sowie in einem Falle zentrale Nekrosen (Versuch 1), in einem anderen großtropfige Verfettung (Versuch 3). Daneben kommen stets Rundzelleninfiltrate und Granulome als Zeichen entzündlich-reparativer Vorgänge vor. Nach Absetzen der Behandlung nehmen die degenerativen Zeichen um so mehr ab, je länger die letzte Injektion zurückliegt; gegen Ende der Beobachtungszeit besteht außer den Speicherungen in den KUPFFERschen Zellen nur noch eine Aufhellung der Leberzellen.

Zusammenfassend darf man also sagen, daß die infolge der Speicherungsvorgänge in der Leber auftretenden histologischen Veränderungen

nur vorübergehender und reversibler Natur sind; sie sind wenige Wochen nach Versuchsende zum größten Teil wieder verschwunden (Versuch 5—8). Damit sind unsere Befunde den von Vincke und Oelkers sowie von Fischler und Roeckl erhobenen qualitativ ähnlich, doch sind die im vorliegenden Falle beobachteten Veränderungen der niedrigeren Dosis entsprechend weitaus geringer. Ebenso wie Fischler und Roeckl finden auch wir eine gute Rückbildungsneigung.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Auf Grund der in den drei bisherigen Mitteilungen über Thromboseprophylaxe mit organischen Salzen seltener Erden mitgeteilten Befunde darf unseres Erachtens angenommen werden, daß das Neodymnicotinat eine Verbindung ist, die bereits viele der an ein blutgerinnungshemmend wirkendes Thromboseprophylaktikum zu stellenden Anforderungen erfüllt. Die Verbindung besitzt eine geringe Toxizität, weist nicht die schädliche Kreislaufwirkung anderer Salze seltener Erden auf und wirkt stark blutgerinnungshemmend. Es konnte gezeigt werden, daß man mit ihrer Hilfe bei zwei verschiedenen Methoden die Entstehung von Thromben verhüten konnte, die bei unbehandelten Kontrolltieren fast immer auftraten. Wir sind uns durchaus bewußt, daß auch bei den von uns angewandten Verfahren zur experimentellen Thromboseerzeugung sicherlich manche Faktoren, die bei der menschlichen Fernthrombose eine Rolle spielen[12] gar nicht oder nur unvollkommen nachgeahmt werden können; es ist dies aber ein Nachteil, der den übrigen in der Literatur angegebenen Methoden in noch weit höherem Maße anhaftet.

Nach unseren bisherigen Untersuchungen glauben wir uns zu dem Schluß berechtigt, daß eine nach Art des Neodymnicotinats zusammengesetzte Verbindung bei der Verhütung postoperativer Thrombosen von Vorteil sein könnte. Der klinischen Erprobung des Neodymnicotinats selbst steht vorderhand noch die Schwerlöslichkeit des Salzes im Wege. Versuche zur Lösung dieses Problems sind im Gange.

Literatur.

Best, C. H., C. Cowan and D. L. MacLean: Science **85**, 338 (1937). — J. Physiol. (Brit.) **92**, 20 (1938). — Dietrich, A.: Arch. path. Anat. u. Physiol. **307**, 281 (1941). — Thrombose. Berlin 1932. — Dyckerhoff, H. u. N. Goossens: Z. exper. Med. **106**, 181 (1939). — Fischler, F. u. K. W. Roeckl: Arch. exper. Path. (D.) **189**, 4 (1938). — Rowntree, L. G. and T. Shionoya: J. exper. Med. (Am.) **46**, 7 (1927). — Shionoya, J. exper. Med. (Am.) **46**, 13, 19, 957, 963 (1927). — Vincke, E.: Z. exper. Med. **113**, 522 (1944). — Vincke, E. u. H. E. Never: Z. exper. Med. **113**, 536 (1944). — Vincke: E. u. H. A. Oelkers: Arch. exper. Path. (D.) **188**, 465 (1938).

[12] Vgl. hierzu R. Geissendörfer: Thrombose und Embolie, S. 88. Leipzig: Johann Ambrosius Barth 1935.

Die Wirkung von Schwefelwasserstoff und seinen Oxydationsprodukten auf Bernsteinsäuredehydrase.

Von

H. Bergstermann und H. D. Lummer.

(Eingegangen am 4. November 1946.)

Hopkins[1] und eine Reihe anderer Autoren[2] haben gezeigt, daß Bernsteinsäuredehydrase durch Oxydationsmittel vergiftet werden kann. Selbst schwache Oxydationsmittel wie S-S-Glutathion führten bei genügend langer Einwirkungszeit zu einer Inaktivierung des Enzyms. Die Inaktivierung ist reversibel und kann durch Reduktionsmittel wie SH-Glutathion und Cystein wieder völlig aufgehoben werden. Diese Versuche lassen die Vermutung zu, daß es sich bei den oxydationsempfindlichen Gruppen in der Bernsteinsäuredehydrase um SH-Gruppen handelt. In weiteren Versuchen konnte von Hopkins und Mitarbeitern gezeigt werden, daß Gifte, von denen bekannt ist, daß sie Thiolgruppen angreifen, die Aktivität der Bernsteinsäure herabsetzen bzw. vernichten. Typische Vergiftungen, die auf eine Schädigung von SH-Gruppen hinweisen, wurden z. B. mit Maleinsäureanhydrid, Halogenessigsäure, Alloxan und Kupfersalzen erzielt. Von Bergstermann und Mangler[3] wurde gezeigt, daß die bereits von Collet[4] und Labes[5] beobachtete Vergiftung von Bernsteinsäuredehydrase durch Tellurit und Selenit reversibel ist und durch Behandlung mit Cystein völlig wieder aufgehoben werden kann. Auch diese Versuche lassen sich mit der Annahme einer Vergiftung von Thiolgruppen durch Tellurit und Selenit gut vereinbaren. Bei dem Versuch, die Vergiftung der Bernsteinsäuredehydrase an Stelle von Cystein durch eine Nachbehandlung mit Schwefelwasserstoff wieder aufzuheben, trat eine Vergiftung auch der Kontrollen ein, so daß das Ferment bereits durch Schwefelwasserstoff selbst geschädigt zu werden schien. Leiteten wir Schwefelwasserstoff durch eine Enzymlösung und versuchten anschließend, durch Ausblasen mit Luft den Schwefelwasserstoff zu beseitigen, so erwies sich das Enzym bei nachfolgender Probe als inaktiv. Diese Beobachtung war auffällig, weil die oben geschilderten Versuche auf eine Empfindlichkeit der Bernsteinsäuredehydrase gegen Oxydationsmittel hinwiesen, während Reduktionsmittel (z. B. Cystein) im Gegenteil eine Reaktivierung des Enzyms verursachten. Es ergab sich daraus für uns die Vermutung, daß *nicht der Schwefelwasserstoff selbst die Vergiftung hervorruft, sondern Oxydationsprodukte*, d. h. also polysulfidähnliche Körper oder bei der Polysulfidbildung entstehende Peroxyde.

Die Vergiftung der Succinoxydase durch kolloiden Schwefel und durch H_2S wurde bereits 1915 von Thunberg[6] beobachtet. Jedoch erlauben diese Versuche keinen Rückschluß darauf, ob tatsächlich die Bernsteinsäuredehydrase vergiftet wurde oder ob der sauerstoffaktivierende Teil des Fermentsystems betroffen wurde. Später beschreibt auch Euler[2] die Inaktivierung von Bernsteinsäuredehydrase durch Schwefelwasserstoff und eine deutliche Hemmung durch Natriumsulfid, während er bei Einwirkung von Natriumhydrosulfit auf das Enzym eine Aktivierung feststellen konnte.

Um zu beweisen, daß Oxydationsprodukte des Schwefelwasserstoffes und nicht der Schwefelwasserstoff selbst das Enzym schädigten, mußte die Oxydation von H_2S verhindert und der Versuch unter Ausschluß von O_2 mit der Methylenblaumethodik durchgeführt werden. Dabei kam es darauf an, Schwefelwasserstoff genügend sauerstofffrei zu gewinnen, mit dem vom Sauerstoff freigemachten Ferment eine Zeitlang zusammenzubringen und anschließend den Schwefelwasserstoff wieder möglichst restlos zu entfernen, weil bereits geringe Mengen H_2S genügen, um das zur Aktivitätsprüfung zugesetzte Methylenblau zu entfärben. Da das Ausblasen von Schwefelwasserstoff aus Enzymlösungen mit O_2 freigemachten Gasen Schwierigkeiten macht, arbeiteten wir nicht mit Enzymlösungen, sondern verwandten einen Enzymbrei, der nach genügend langer Einwirkungszeit von Schwefelwasserstoff abgenutscht und so lange gewaschen werden kann, bis das Ferment im succinatfreien Kontrollversuch keine nennenswerte Methylenblauentfärbung mehr zeigt. In Versuchen der eben beschriebenen Art konnte eine *Vergiftung der Bernsteinsäuredehydrase mit Schwefelwasserstoff nie beobachtet* werden. Im Gegenteil hatten wir den Eindruck, daß in mehreren Versuchen, die mit einem weniger aktiven Enzym ausgeführt wurden, sogar eine geringe Aktivierung zu beobachten war. Diese Aktivierung muß jedoch mit Vorsicht beurteilt werden, da eine geringe Beimengung reduzierend wirkender Schwefelwasserstoffabkömmlinge nicht immer ganz sicher ausgeschlossen werden kann. Würde dagegen im Anschluß an die Einwirkung von Schwefelwasserstoff auf das Enzym 3 bis 5 Min. Luft durch das Enzym-Schwefelwasserstoffgemisch durchgeleitet, so zeigten die nachfolgenden Kontrollen, daß das Enzym jetzt weitgehend oder sogar vollständig inaktiviert worden war. Auffällig war ferner in diesen mit Sauerstoffdurchleitung durchgeführten Versuchen, daß die aus dem Schwefelwasserstoff entstehenden, aber Methylenblau noch reduzierenden Oxydationsprodukte viel fester am Enzym hafteten als Schwefelwasserstoff selbst. Trotz reichlichen Nachwaschens des Enzymbreies mit Wasser bzw. mit mol/15 Phosphatpuffer p_H 7,3 zeigten auch die Kontrollen ohne Succinat ziemlich rasche Methylenblauentfärbung. Erst wenn der Enzymbrei noch 2 mal je 15 Min. mit Phosphatpuffer p_H 7,3 im Schüttelthermostaten behandelt wurde, ergab das Ferment mit und ohne Succinat keine nennenswerte Methylenblauentfärbung mehr, während der Enzymbrei in den Kontrollreihen, die in gleicher Weise mit H_2S aber ohne

Luftdurchleitung behandelt waren, voll aktiv war. Auch Luftdurchleitung ohne Schwefelwasserstoffbehandlung schädigte den Enzymbrei nicht.

Durch diese Versuche konnte also bewiesen werden, daß Sauerstoffeinwirkung auf den Schwefelwasserstoff für die Vergiftung von Bernsteinsäuredehydrase unbedingt erforderlich ist, bzw. daß Oxydationsprodukte von Schwefelwasserstoff die Giftwirkung verursachen. Eine Vergiftung konnte auch erzielt werden, wenn man Na-Sulfid vorher mit Luft schüttelte und dann erst auf das Enzym einwirken ließ. Es handelt sich demnach bei den giftig wirkenden Körpern um stabilere wahrscheinlich den Polysulfiden nahestehende Körper und nicht um bei der Oxydation entstehende instabile Oxydationsprodukte.

Da Schwefelwasserstoff bzw. seine Oxydationsprodukte mit Phthalsäurehydrazid und Hämatin[7] ein deutliches Aufleuchten zeigen, muß auch damit gerechnet werden, daß bei der Schwefelwasserstoffoxydation entstehende Peroxyde bei der Vergiftung des Enzyms eine Rolle spielen. Bemerkenswert ist, daß dieses Aufleuchten nur einen Augenblick lang beobachtet werden kann und um so länger anhält, je mehr Hämatin dem Phthalsäurehydrazid zugesetzt wird. Das im Luminolreagens katalytisch wirksame Hämatin wird demnach von Schwefelwasserstoff bzw. seinen Oxydationsprodukten vergiftet oder zerstört und dadurch schnell unwirksam.

Die *Inaktivierung der Bernsteinsäuredehydrase durch die Oxydationsprodukte des Schwefelwasserstoffs ist reversibel* und kann durch Nachbehandlung *mit Cystein* völlig beseitigt werden. Eine gewisse Wiederherstellung der Aktivität erfolgt auch durch nachträgliche Behandlung mit Schwefelwasserstoff unter Sauerstoffabschluß, jedoch ist diese weniger vollständig als die durch Cystein erzielte. *Offenbar ist die Reduktionswirkung von Cystein eine intensivere als die von Schwefelwasserstoff.*

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, daß bei *Anwesenheit von Succinat die Bernsteinsäuredehydrase* durch die Oxydationsprodukte des Schwefelwasserstoffs *weniger stark vergiftet* wird. Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß die giftempfindlichen Teile des Ferments mit dem Substrat in innige Berührung treten und dadurch der Einwirkung der durch Oxydation des Schwefelwasserstoffs entstehenden Gifte entzogen werden. Es handelt sich also bei diesen giftempfindlichen Fermentanteilen vermutlich um die gleichen Atomgruppierungen, die z. B. durch Tellurit, Selenit und Arsenit[3] vergiftet werden. Auch die fermentschädigende Wirkung dieser Gifte kann durch Zusatz von bernsteinsaurem Natrium weitgehend verhindert und durch Cysteinzusatz wieder reaktiviert werden.

Versuchsteil.

I. Enzympräparate und Versuchslösungen.

Da sich Schwefelwasserstoff aus Enzymlösungen nur schwer entfernen läßt, verwandten wir für unsere Versuche in der Regel Enzymbrei, der durch Auswaschen mit Wasser leichter von H_2S und seinen Oxydationsprodukten befreit werden kann. Dieser Enzymbrei bestand entweder aus frischem Material oder wurde aus einem getrockneten Dauerpräparat hergestellt. Da das frische Material meist innerhalb

einiger Tage an Wirksamkeit verliert, wurden die meisten Versuche mit dem aus Trockenmaterial hergestellten Enzymbrei angesetzt.

Zur Herstellung des frischen Enzymbreies wurde mageres Rind- oder Hundefleisch mehrere Male durch eine Fleischmühle getrieben, 3mal je 5 Min. mit der 10fachen Menge dest. Wassers gewaschen und in einem Nesseltuch abgepreßt. Das Präparat wurde im Eisschrank aufbewahrt. Das Dauerpräparat wurde in gleicher Weise behandelt. Nach dem Abpressen wurde jedoch der Muskelbrei in dünner Schicht auf einen Filtrierpapierbogen ausgebreitet und im Luftstrom eines Ventilators getrocknet. Die Aufbewahrung erfolgte im Exsikkator im Eisschrank. Dieses Präparat behielt wochenlang seine volle Aktivität. Zum Versuche wurde eine bestimmte Menge dieses Trockenpräparates abgewogen und vor dem Versuchsansatz $^1/_4$ Stunde in der im Versuchsansatz vorgesehenen Phosphatpuffermenge eingeweicht.

Zur Herstellung des Phosphatpuffers benutzten wir von der Fa. Merck gelieferte Sörensen-Präparate. Phosphatpuffer mol/15 1 p/3 s bedeutete z. B., daß der Phosphatpuffer aus einem Teil primären und drei Teilen sekundären mol/15 Phosphat besteht. Seine Wasserstoffionenkonzentration beträgt $5 \cdot 10^{-8}$. Bei der Herstellung unserer sauerstofffreien Schwefelwasserstofflösung benutzten wir Bariumsulfid 80% der Fa. Merck und 10% Salzsäure pro analysi, die aus Acidum hydrochloricum (Merck) hergestellt war. In einem geschlossenen System, aus dem durch Evakuieren der Sauerstoff möglichst weitgehend entfernt worden war, wurde Wasser mit Schwefelwasserstoff gesättigt. Durch ein Manometer konnte Sättigung bei Atmosphärendruck festgestellt werden. Der H_2S-Gehalt wurde vor jedem Versuch mit Kaliumpermanganat titrimetrisch bestimmt.

II. Versuche.

a) Einwirkung von Schwefelwasserstoffwasser auf den Enzymbrei mit und ohne Sauerstoffdurchleitung.

Tabelle 1 zeigt einen Versuch, in dem Schwefelwasserstoffwasser 15 Min. lang unter Sauerstoffabschluß auf das Enzym einwirken konnte. Versuchsansatz A wurde anschließend 5 Min. lang mit Luft durchströmt. Versuchsansatz B mit Aqua dest. an Stelle von Schwefelwasserstoffwasser wurde ebenso behandelt wie Versuchsansatz A. Nach der Luftdurchblasung (je Sekunde 2—3 Luftblasen) wurde zur Entfernung von H_2S und seinen Oxydationsprodukten der Enzymbrei abgenutscht und mehrfach mit Aqua dest. gewaschen. Diese Behandlung genügte aber nicht, um den Enzymbrei hinreichend von reduzierend wirkenden Produkten des H_2S zu befreien, wie Kontrollen mit Methylenblau ohne Succinat zeigten. Deshalb wurde noch 2mal 15 Min. lang mit je 20 ccm mol/4 Phosphatpuffer bei 37° im Schüttelthermostaten geschüttelt, anschließend abgenutscht und mit Aqua dest. gründlich gewaschen. Die Versuchsansätze C und D wurden nicht mit Luft durchströmt, im übrigen aber wie A und B behandelt.

Die Prüfung auf Enzymaktivität erfolgte in Thunberg-Röhrchen nach der Methylenblaumethode. In jedes Thunberg-Röhrchen (vgl. Tabelle 1) wurde $^1/_4$ des in den Ansätzen A, B. usw. vorbehandelten Enzymbreies gegeben. Dazu kam Phosphatpuffer, Succinat, Aqua dest. und Methylenblaulösung. Die Kontrollen erhielten kein Succinat. Anschließend wurde 3 Min. lang an der Wasserstrahlpumpe evakuiert und die Röhrchen in einen Schüttelthermostaten von 37° versenkt.

Der Versuchsansatz D ohne Schwefelwasserstoffbehandlung und ohne Luftdurchblasung zeigte eine Entfärbungszeit von 6 Min., ebenso entfärbte Versuchsansatz B in 6 Min. Daraus geht hervor, daß Luftdurchblasung ohne Behandlung mit Schwefelwasserstoff das Ferment offenbar nicht schädigt.

Versuchsansatz C, bei dem das Enzympräparat 20 Min. lang einer Behandlung mit Schwefelwasserstoffwasser allerdings unter Luftabschluß unterworfen wurde,

Tabelle 1.

In allen Ansätzen 2 g getrockneter Muskelbrei, 20 ccm Phosphatpuffer (m/4, pr/sk — 1 : 3) aufgefüllt auf 60 ccm Gesamtflüssigkeit.

Nr.	A	B	C	D
H_2S Wasser 0,053 mol ccm	30	—	30	—
Einwirkungsdauer	15 Min. bei 37° im Sch.-Therm. unter O_2-Abschluß anschl. 5 Min. Luftdurchl.		20 Min. bei 37° im Sch.-Therm. unter O_2-Abschluß	

Alle Ansätze abgenutscht, mit Aqua dest. gründlich gewaschen, 2mal in 20 ccm Phosphatpuffer aufgenommen und 15 Min. geschüttelt bei 37°, nochmals abgenutscht und gewaschen.

In THUNBERG-Röhrchen: $^1/_4$ der abgenutschten Menge Muskelbrei, versetzt mit 2 ccm m/15 Phosphatpuffer, 0,5 ccm Methylenblau m/800 und Aqua dest. ad 4 ccm; evakuiert.

Na-Succinat	0,2	—	0,2	—	0,2	—	0,2	—
Entfärbungsdauer Min. . .	55	75	6	n. entf.	5	195	6	n. entf.

zeigt sogar eher eine etwas kürzere Entfärbungszeit. (Auch in weiteren Kontrollversuchen, bei denen die Einwirkung von Schwefelwasserstoff über wesentlich längere Zeiten erfolgte, war nie eine Schädigung des Enzympräparates zu beobachten, wenn der gleichzeitige Zutritt von Sauerstoff verhindert wurde.)

Dagegen zeigt Versuchsansatz A, bei dem nach einer 15 Min. langen Einwirkung von Schwefelwasserstoff Luft durchgeblasen wurde, eine Verlängerung der Entfärbungszeit auf 55 Min. Durch die Oxydationsprodukte des Schwefelwasserstoffes wurde offenbar das Ferment schwer geschädigt.

Bemerkenswert ist auch das Verhalten der Kontrollen ohne Succinat. Wurde das Enzympräparat nicht mit H_2S behandelt, war nach 4 Stunden noch keine nennenswerte Verfärbung der Kontrollen erkennbar. Auch bei Luftabschluß ließ sich der Schwefelwasserstoff noch verhältnismäßig leicht durch Auswaschen entfernen, so daß die Kontrolle im Versuchsansatz C erst nach 195 Min. entfärbt war. Dagegen macht die Beseitigung reduzierend wirkender Abkömmlinge des Schwefelwasserstoffes nach Behandlung mit Luftsauerstoff erhebliche Schwierigkeiten. Trotz mehrfachen Waschens und Schüttelns mit Phosphatpuffer gelingt deren Beseitigung nur unvollkommen. Nach 75 Min. ist das Methylenblau im Ansatz A auch in der Kontrolle entfärbt.

b) Versuch mit einer luftgeschüttelten Natriumsulfidlösung.

Um zu entscheiden, ob der Oxydationsprozeß als solcher, d. h. unstabile Zwischenprodukte während der Oxydation die Vergiftung bewirken, oder ob stabile Oxydationsprodukte des Schwefelwasserstoffes wirksam sind, wurde Versuch Tabelle 2 angesetzt.

Vor der Zugabe des Enzympräparates wurde Natriumsulfidlösung in Rundkolben von 100 ccm Inhalt 15 Min. bei 37° geschüttelt. Für Versuchsansatz A gaben wir 15 ccm 0,1 molare Natriumsulfidlösung und 5 ccm Aqua dest. in den Rundkolben. Nach 15 Min. langem Schütteln im Thermostaten setzten wir durch 3 ccm normale Salzsäure den Schwefelwasserstoff frei und füllten auf 25 ccm auf. Diese Lösung wird in der Tabelle als Na_2S-Lösung Alk. bezeichnet. Die Na_2-S-Lösung für Versuchsansatz B wurde in der Weise hergestellt, daß wir zu 15 ccm 0,1 molare Na_2S-Lösung

Tabelle 2.

In allen Ansätzen 1 g getrockneter Muskelbrei, 10 ccm Phosphatpuffer (m/4, pr/sk = 1 : 3) aufgefüllt auf 50 ccm Gesamtflüssigkeit.

Nr.	A	B	C
Na_2S-Lösung (alk.) ccm	20	—	—
Na_2S-Lösung (neutr.) ccm	—	20	—

Einwirkungsdauer: 30 Min. bei 37° im Schütteltherm ostaten, anschließend auf der Nutsche gründlich gewaschen, 2mal in 20 ccm m/15 Phosphatpuffer 15 Min. bei 37° geschüttelt und abgenutscht.

In Thunberg-Röhrchen: $^1/_2$ der abgenutschten Menge Muskelbrei versetzt mit 2 ccm m/15 Phosphatpuffer, 0,5 ccm Methylenblau m/800 und Aqua dest. ad 4 ccm; evakuiert.

Na-Succinat ccm	0,2	—	0,2	—	0,2	—
Entfärbungsdauer Min.	30	35	35	46	9	n. entf.

sofort 3 ccm normale Salzsäure zufügten, auf 20 ccm auffüllten und dann im Schütteltherm ostaten 15 Min. unter Lufteinwirkung schüttelten. Danach wurde auf 25 ccm aufgefüllt. Dann wurde das Muskelpräparat in Phosphatpuffer eingeweicht und die Natriumsulfidlösungen, die durch ausfallenden kolloidalen Schwefel getrübt waren, mit Aqua dest. voll aufgefüllt und das Gefäß verschlossen. Vollständige Sauerstofffreiheit konnte in diesen Versuchen nicht erzielt werden, weil durch Evakuieren unbekannte Schwefelwasserstoffmengen mitentfernt worden wären, so daß allerdings nur in viel geringerem Umfang auch hier die Möglichkeit von Oxydation bei Enzymanwesenheit und damit die Einwirkung sich rasch zersetzender Zwischenprodukte auf das Enzym gegeben war. Anschließend wurde wiederum abgenutscht und 2mal mit Phosphatpuffer geschüttelt und mit Aqua. dest. gewaschen. Die Schädigung des Fermentes geht aus den Entfärbungszeiten deutlich hervor. Ob die Fermentvergiftung im Ansatz A und B größere Unterschiede aufweist, läßt sich bei den relativ schnellen Entfärbungszeiten, die bereits die Kontrollen ohne Succinat aufweisen, nicht entscheiden; die reichlich ausgefallenen, Methylenblau reduzierenden Schwefelkolloide ließen sich nämlich trotz reichlichen Waschens nicht restlos vom Enzym abtrennen.

Die Versuchsansätze der Tabelle 2 zeigen, daß auch die stabilen Oxydationsprodukte des Schwefelwasserstoffes in der Lage sind, eine Schädigung der Succinodehydrase zu bewirken. Über Art und Menge der gebildeten wirksamen Oxydationsprodukte des H_2S lassen uns die Versuche im unklaren. Um thiosulfatähnliche Stoffe handelt es sich nicht. Bei Behandlung von Succinodehydrase mit Thiosulfat und nachfolgender Durchströmung mit O_2 wird nur eine ganz unwesentliche Hemmung des Fermentes erzielt.

c) Reversibilität der mit Hilfe von Oxydationsprodukten des Schwefelwasserstoffes hervorgerufenen Succinodehydrasevergiftung durch Behandlung mit Cystein.

Der folgende Versuch zeigt, daß die durch Oxydationsprodukte des H_2S verursachte Vergiftung der Bernsteinsäuredehydrase reversibel ist und durch Cystein wieder aufgehoben werden kann. Es handelt sich demnach nur um leichte Verände-

Tabelle 3.

In allen Ansätzen 1 g frischer Muskelbrei, 20 ccm Phosphatpuffer (mol/4, pr/sk = 1 : 3) aufgefüllt auf 60 ccm Gesamtflüssigkeit.

Nr.	A	B	C	D
H_2S Wasser 0,052 mol ccm	30	30	30	—
Unter O_2-Abschluß bei 37° geschüttelt				
Einwirkungszeit Min.	15	15	25	25
O_2-Durchleitung Min. . . .	10	10	—	—
Abgenutscht und gründlich mit Aqua dest. gewaschen; in 20 ccm Phosphatpuffer (m/4, pr/sk = 3 : 1) aufgenommen, dazu				
Cystein-HCl mg	50	—	—	—
Einwirkungszeit 1 Stunde bei 37° geschüttelt, abgenutscht, 2mal 15 Min. bei 37° mit m/15 Phosphatpuffer (pr/sk = 1 : 3) geschüttelt und abgenutscht.				
In THUNBERG-Röhrchen: $^1/_2$ der abgenutschten Menge Muskelbrei versetzt mit 2 ccm m/15 Phosphatpuffer, 0,6 ccm Methylenblau m/800 und Aqua dest. ad 4 ccm; evakuiert.				
Na-Succinat mol 5 . . .	0,2 —	0,2 —	0,2 —	0,2 —
Entfärbungszeit Min. . . .	11 260	115 130	13 240	15 n.entf.

rungen vermutlich oxydativer Natur und nicht um eine Denaturierung der Eiweißkomponente des Fermentes durch zerstörend wirkende Schwefelkolloide.

In den Ansätzen A und B konnte Schwefelwasserstoff 15 Min. lang auf das Enzym einwirken, anschließend wurde 10 Min. lang Sauerstoff durchgeleitet. In den Ansätzen C und D konnte die gleiche Menge Schwefelwasserstoff unter Sauerstoffabschluß 25 Min. auf das Enzym einwirken. Anschließend wurde das Enzym im Versuchsansatz A 1 Stunde im Schüttelthermostaten bei 37° mit 50 mg Cystein behandelt. Der Versuchsansatz A zeigt eine Entfärbung von 11 Min., während ohne Behandlung des Enzyms mit Schwefelwasserstoff Entfärbung in 15 Min. erfolgt (Versuchsansatz D). Bei Behandlung mit Schwefelwasserstoff und nachfolgender Sauerstoffdurchströmung aber ohne Cysteinbehandlung, tritt Entfärbung erst nach 115 Min. ein (Ansatz B) und zeigt damit an, daß eine schwere Schädigung der Enzymaktivität eingetreten ist. Behandlung des Enzyms mit Schwefelwasserstoff bei Abschluß von Sauerstoff schädigt das Ferment nicht, im Gegenteil scheint bei 2 Min. kürzerer Entfärbungszeit sogar eine geringe Aktivierung des Fermentes erfolgt zu sein (Ansatz C).

d) Reversibilität der mit Hilfe von Oxydationsprodukten des Schwefelwasserstoffes hervorgerufenen Succinodehydrasevergiftung durch Behandlung mit Schwefelwasserstoff unter O_2-Abschluß.

In weiteren Versuchen prüften wir die Frage, ob der gleiche Entgiftungseffekt, der sich mit Cystein erreichen läßt, auch durch nachfolgende Behandlung mit Schwefelwasserstoff unter O_2-Abschluß erhalten werden kann. Das Versuchsergebnis ist in Tabelle 4 dargestellt. Das Muskelpräparat (2 g) wurde 30 Min. lang der Einwirkung von Schwefelwasserstoff bei 37° überlassen. Anschließend wurde 10 Min. Luft durchgeleitet, dann der Brei abgenutscht und mit Aqua dest. gewaschen. Die Hälfte des abgenutschten Breies (A_1) wurde mit Phosphatpuffer versetzt, evakuiert und unter

Tabelle 4.

In beiden Ansätzen 2 g getrockneter Muskelbrei, 10 ccm Phosphatpuffer (m/4, pr/sk = 1 : 3), aufgefüllt auf 60 ccm Gesamtflüssigkeit.

Nr.	A	B
H_2S-Wasser 0,052 mol ccm	40	—

Einwirkungsdauer: 30 Min. bei 37° geschüttelt, dann 10 Min. Luft durchgeleitet, abgenutscht und mit Aqua dest. gewaschen. Weiterverarbeitet in 3 Ansätzen A_1, A_2 und B.

Je Ansatz $^1/_2$ der abgenutschten Breimenge versetzt mit 20 ccm Phosphatpuffer (m/4, pr/sk = 3 : 1); A_2 und B aufgefüllt auf 60 ccm Gesamtflüssigkeit mit Aqua dest.; evakuiert.

	A_1	A_2	B
H_2S-Wasser 0,052 mol ccm	40	—	—

Unter möglichster Vermeidung von O_2 bis zum Verschluß gefüllt und 60 Min. bei 37° im Schütthermostaten, dann gründlich auf der Nutsche gewaschen, 2mal mit mol/15 Phosphatpuffer 15 Min. bei 37° geschüttelt, abgenutscht und gewaschen.

In Thunberg-Röhrchen: $^1/_2$ der abgenutschten Menge Muskelbrei versetzt mit 2 ccm m/15 Phosphatpuffer (pr/sk = 1 : 3), 0,5 ccm Methylenblau m/800 ad 4 ccm Aqua dest.; evakuiert.

Na-Succinat mol/5 ccm	0,2	—	0,2	—	0,2	—
Entfärbungsdauer Min.	52	115	95	125	10	n. entf.

Luftabschluß einer erneuten Behandlung mit Schwefelwasserstoff unterworfen. Die andere Hälfte des Enzymbreies wurde nicht mit Schwefelwasserstoff nachbehandelt. Die Entfärbung trat nach 95 Min. ein (A_2), während A_1 bereits nach 52 Min. entfärbt war. Die Behandlung mit Schwefelwasserstoff hatte demnach zu einer gewissen Reaktivierung des Enzymbreies geführt, die jedoch wesentlich schwächer war, als wir sie bei Nachbehandlung mit Cystein beobachten konnten. Die Kontrolle B entfärbte in 10 Min. Hinsichtlich seines Reduktionsvermögens scheint unter den hier vorliegenden Versuchsbedingungen der Schwefelwasserstoff dem Cystein wesentlich unterlegen zu sein.

e) Succinatschutz bei Vergiftung der Succinodehydrase durch Oxydationsprodukte des Schwefelwasserstoffs.

In den Versuchen von Bergstermann und Mangler[3] war gezeigt worden, daß Tellurit, Selenit und Arsenit in Abwesenheit von Succinat wesentlich giftiger auf Bernsteinsäuredehydrase wirken. Auch in den Versuchen von Hopkins gelang die Inaktivierung des Fermentes durch oxydiertes Glutathion nur bei Abwesenheit von Succinat. Es wurde deshalb untersucht, ob die Vergiftung durch Oxydationsprodukte des Schwefelwasserstoffs durch Succinat verhindert bzw. verzögert werden kann. Wie die Versuche in Tabelle 5 zeigen, ist dies tatsächlich der Fall, jedoch erscheint der Schutz nicht so deutlich, wie wir ihn z. B. bei der Telluritvergiftung beobachten konnten. Die Oxydation des Schwefelwasserstoffes wurde in diesen Versuchen durch 30 Min. langes Schütteln mit Luft in 100-ccm-Rundkolben erreicht.

Tabelle 5.

In allen Versuchsansätzen 1 g getrockneter Muskelbrei, 5 ccm Phosphatpuffer (m/4, pr/sk = 1 : 3) aufgefüllt auf 20 ccm Gesamtflüssigkeit.

Nr.	A	B	C	D	E
Na-Succinat, m/2 ccm .	—	5	—	5	—
H_2S-Wasser 0,053 mol ccm . . .	—	5	5	1	1

Einwirkungszeit: 30 Min. bei 37° geschüttelt, anschließend abgenutscht und gründlich mit Aqua dest. gewaschen, 2mal mit 30 ccm m/15 Phosphatpuffer (pr/sk = 1 : 3) 30 Min. bei 37° geschüttelt, abgenutscht und gewaschen.

In THUNBERG-Röhrchen: $^1/_2$ der abgenutschten Menge Muskelbrei versetzt mit 2 ccm m/15 Phosphatpuffer (pr/sk = 1 : 3), 0,5 ccm Methylenblau m/800 ad 3,5 ccm Gesamtflüssigkeit; evakuiert.

Na-Succinat m/5 ccm .	0,2	—	0,2	—	0,2	—	0,2	—	0,2	—
Entfärbungszeit Min. .	12	n.entf.	48	92	98	90	17	135	32	150

Bemerkungen zu den Versuchsergebnissen.

Die Versuchsergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, daß die Aktivität der Bernsteinsäuredehydrase entgegen anderslautenden Angaben durch H_2S nicht gehemmt wird. Erst die bei Anwesenheit von Sauerstoff auftretenden Oxydationsprodukte des H_2S verursachen durch Oxydation von SH-Gruppen der Bernsteinsäuredehydrase eine Inaktivierung derselben. Daraus geht hervor, daß bei einer Betrachtung der biologischen Wirkung von Schwefelwasserstoff unterschieden werden muß zwischen den Wirkungen, die vom Schwefelwasserstoff selbst ausgeübt werden, und jenen, die Oxydationsprodukten des H_2S zugeschrieben werden müssen. Schwefelwasserstoff vergiftet infolge seiner Affinität zu Schwermetallen eine Reihe von Schwermetallkatalysatoren und kann auf Grund dieser Eigenschaft in genügender Konzentration zu blitzartig auftretenden schwersten Vergiftungserscheinungen führen. Im Körper wird es schnell oxydiert. Daß dabei Vergiftungserscheinungen durch reduktive Wirkungen an biologischen Elementen auftreten, ist nicht sehr wahrscheinlich. Sein Reduktionsvermögen scheint jedenfalls geringer zu sein als das des Cysteins und des Glutathions. In unseren Versuchen war es dem Cystein in seiner Fähigkeit, Bernsteinsäuredehydrase zu reaktivieren, deutlich unterlegen. Oxydationsprodukte des Schwefelwasserstoffes, sogar kolloider Schwefel, werden von Cystein, Glutathion und anderen fixen Thiolgruppen des Körpers leicht reduziert, wie zum Teil schon vor vielen Jahren von HEFFTER[8] festgestellt wurde.

Es muß aber damit gerechnet werden, daß ein Teil der Schädigungen bzw. biologischen Wirkungen, die nach Schwefelwasserstoffeinwirkung auftreten, Oxydationsprodukten des H_2S zugeschrieben werden muß. Der Schwefelwasserstoff kann als kleines lipoidlösliches Molekül leicht durch Zellmembranen eindringen und dann im Zellinnern oxydiert werden. Auf diesen Vergiftungsmechanismus ist von Labes[9] bei seinen Untersuchungen über die Hämolyse roter Blutkörperchen und über die Aufhebung der Erregbarkeit von Nerven und Muskeln nach H_2S-Vergiftung und Sauerstoffeinwirkung hingewiesen worden. Labes denkt dabei vor allem an Schädigungen, die durch feinste Schwefelkolloide an Membranen von roten Blutkörperchen und Nerven und Muskelpräparaten hervorgerufen werden.

Unsere oben geschilderten Versuche zeigen, daß auch spezifische Fermentschädigungen durch Oxydationsprodukte des Schwefelwasserstoffes hervorgerufen werden, die durch anschließende Behandlung mit Reduktionsmitteln wie Cystein wieder beseitigt werden können. Es können also durch Vermittlung von Oxydationsprodukten des Schwefelwasserstoffes oxydative Schäden an Fermenten und anderen biologischen Elementen gesetzt werden, die ohne H_2S Gegenwart gegen Sauerstoff unempfindlich sind. Es ist dies neben den bereits bekannten Veränderungen des roten Blutfarbstoffes im Sinne der Verdohämochromogenbildung ein weiteres Beispiel dafür, daß der im Körper stattfindende Oxydationsprozeß des Schwefelwasserstoffs durchaus nicht nur als ein Entgiftungsprozeß angesehen werden darf. Soweit es sich dabei um die Oxydation von Thiolgruppen handelt, ist allerdings zu berücksichtigen, daß der Organismus weitgehend befähigt ist, das Verhältnis von SH- und SS-Gruppen seinen Erfordernissen anzupassen und eventuelle durch Oxydationsprodukte des H_2S verursachte Störungen auszugleichen. Die Regulierung des Redoxgleichgewichtes von Thiolgruppen spielt ja bei einer Reihe wichtigster Stoffwechselmechanismen eine ausschlaggebende Rolle. Besonders im Glutathion verfügt der Organismus über ein ausgezeichnetes Mittel, auftretende Störungen zu beseitigen. Das dürfte der Grund sein, daß Vergiftungserscheinungen durch Oxydationsprodukte des H_2S weniger oft in den Vordergrund des Vergiftungsbildes treten. Auch unsere Versuche zeigten ja eine völlige Reversibilität der Succinodehydrasevergiftung durch Cystein. Vielleicht ist die immer wieder beobachtete Steigerung des Gluthationgehaltes des Blutes nach Schwefeltherapie als ein Schutzmechanismus des Körpers gegen oxydative Schäden derartiger Schwefelderivate aufzufassen. Vermutlich erfolgt dabei die Ausschüttung von reduziertem Glutathion im Überschuß, womit gleichzeitig eine Mobilisierung der Abwehrkräfte des Körpers verbunden ist. Dabei ist an die Wechselwirkung mit weiteren reduzierenden Wirkstoffen zu denken, die erfahrungsgemäß in die Abwehrvorgänge des Organismus eingreifen. Ich erinnere nur an die Askorbinsäure und an das zweiwertige Eisen, die gemeinsam mit

dem Glutathion bei der Abwehrreaktion und der Bildung von Antikörpern beteiligt sind[10].

Die durch Oxydationsprodukte des Schwefelwasserstoffs auftretenden biologischen Wirkungen sind nur schwer experimentell zu trennen von solchen, die durch Peroxyde gesetzt werden. Schwefelwasserstoff ist ein sehr wirksames Katalasegift. Da nun bei der Oxydation von Schwefelwasserstoff bereits Peroxyd entsteht[7], ist die Mitwirkung von Peroxyden bei allen Versuchen über Oxydationsprodukte des Schwefelwasserstoffes in Rechnung zu stellen. Das gilt für die Untersuchungen an Fermentsystemen und erst recht im Tierversuch und bei Untersuchungen an überlebenden Organen.

Zusammenfassung.

Bernsteinsäuredehydrase wird durch H_2S nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Sauerstoff vergiftet. Die Vergiftung ist reversibel und kann durch Cysteinbehandlung wieder völlig aufgehoben werden.

Auch durch eine erneute Behandlung mit H_2S unter Sauerstoffabschluß kann die Aktivität des Fermentes in gewissem Umfang wieder hergestellt werden, jedoch ist H_2S wesentlich weniger wirksam als Cystein.

Die Giftwirkung wird demnach durch Oxydationsprodukte des Schwefelwasserstoffs, wahrscheinlich Polysulfide, ausgeübt. Die Mitwirkung von Peroxyden kann jedoch dabei nicht sicher ausgeschlossen werden.

Anwesenheit von Succinat übt gegen die Vergiftung eine deutliche Schutzwirkung aus.

Die Bedeutung der Giftwirkung durch Oxydationsprodukte des Schwefelwasserstoffes wird besprochen und auf Beziehungen zum Glutathiongehalt des Blutes und zu Abwehrvorgängen im Organismus hingewiesen.

Literatur.

[1] Hopkins u. Morgan: Biochem. J. (Brit.) **32**, 611 (1938). — Hopkins, Morgan and Lutwak-Mann: Biochem. J. (Brit.) **32**, 1829 (1938). — [2] Euler-Hellström:, Z. physiol. Chem. **255**, 159 (1938). — Bergstermann u. Stein: Biochem. Z. **317**, 217 (1944). — [3] Bergstermann u. Mangler: Biochem. Z. (erscheint demnächst). — [4] Collet u. Mitarb.: J. biol. Chem. (Am.) **58**, 793 (1923); **82**, 429 (1929); **100**, 271 (1932). — [5] Labes: Arch. exper. Path. (D.) **133**, 57 (1928). — Labes u. Krebs: Z. Fermentforsch. **14**, 430 (1935). — Ther: Erscheint demnächst in dieser Zeitschrift. — [6] Thunberg: Skand. Arch. Physiol. (D.) **33**, 223 (1915). — [7] Henze: Klin. Wschr. **1938 I**, 24. — Gleu u. Pfannstiel: J. prakt. Chem. **1936**, 137, 146. — Heubner, W.: Erg. Physiol. **43**, 22. — Michel, H. O.: J. biol. Chem. (Am.) **126**, 323 (1938). — [8] Heffter: Zit. in Heubner: Heffters Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. III/1. 1927. — [9] Labes: Habil.schr. 1928. — Arch. exper. Path. (D.) **129**, 176 (1928); **131**, 305 (1928). — [10] Jusatz, Köster u. Bersin: Klin. Wschr. **1935 II**, 1419. Hochwald: Klin. Wschr. **1936 I**, 894. — Hettsche: Klin. Wschr. **1939 II**, 1437. — Heilmeyer, Stüwe u. Keiderling: Kupfer und Eisen als körpereigene Wirkstoffe. Jena 1941.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg a. d. L.

Die Bedeutung der experimentellen Änderung der Aminooxydase-Aktivität für die Adrenalinwirkung.

Von

Fritz Heim.

(Eingegangen am 11. Oktober 1946.)

Die letzten 25 Jahre haben die Erforschung der Funktionen des vegetativen Nervensystems wesentlich gefördert. Durch die histologischen Untersuchungen von Ph. Stöhr[1] wurde der Nachweis erbracht, daß die feinsten Endausbreitungen des vegetativen Nervensystems ein Synzytium bilden, das jede einzelne Körperzelle umschließt und so jede Zelle des gesamten Organismus dem regulativen Einfluß des vegetativen Nervensystems unterstellt. Aktionsstrommessungen von Adrian[2], Erlanger und Gasser[3] haben gezeigt, daß das vegetative Nervensystem unter einem Dauertonus steht, d. h. daß die vegetativen Nerven kontinuierlich von Erregungsimpulsen in peripherer Richtung durchlaufen werden, die, wie wir heute annehmen dürfen, an den periphersten Endigungen des Systems zur Bildung der chemischen Überträgerstoffe Adrenalin und Azetylcholin führen. Zur Aufrechterhaltung eines normalen vegetativen Tonus muß der Dauerbildung von Adrenalin und Azetylcholin an den adrenergischen bzw. cholinergischen Endigungen des vegetativen Nervensystems eine Dauerzerstörung dieser Stoffe im Zellinnern parallel gehen. Die rasche Zerstörung des Azetylcholins wird durch die Cholinesterase, die des Adrenalins durch eine Aminooxydase bewerkstelligt. Die Cholinesterase findet sich in allen Geweben und auch im Blut, die Aminooxydase wurde bisher vorwiegend in der Leber, Niere und im Zentralnervensystem, doch auch in anderen Organen aufgefunden. Durch Blut und Blutserum dagegen wird Adrenalin nicht zerstört. Die Tatsache ist deshalb wichtig, weil das sympathische System „im Notfall" durch die Bereitstellung des hormonalen Adrenalins des Nebennierenmarks unterstützt wird, das aber nur auf dem Blutweg vom Bildungsort zur Erfolgsorganzelle gelangen kann und auf diesem Wege eine möglichst geringe Einbuße erleiden soll.

Da sich der Tonus des vegetativen Nervensystems den Funktionen und Erfordernissen der einzelnen Organe und den wechselnden Leistungen des Gesamtorganismus anzupassen hat, so werden häufig, vor allem vom sympathischen System, hochgradige und rasche Tonusänderungen gefordert. Diese Änderung kann erfolgen, indem von den vegetativen Zentren

kommende verstärkte Erregungsimpulse zu einer gesteigerten Bildung von Azetylcholin oder Adrenalin an den Nervenendigungen führen und umgekehrt. Neben dieser von den vegetativen Zentren ausgehenden in einer vermehrten Überträgerstoffbildung bestehenden Änderung der Tonuslage kann auch bei gleichbleibender Überträgerstoffbildung der vegetative Tonus eine Änderung erfahren durch eine Beschleunigung oder Hemmung des fermentativen Abbaues des Azetylcholins und Adrenalins. Man könnte diese im Gegensatz zur zentralen als periphere oder zelluläre Tonussteuerung bezeichnen. Die dritte Möglichkeit wäre in einer Änderung der Ansprechbarkeit der Körperzellen den chemischen Überträgerstoffen des vegetativen Nervensystems gegenüber zu suchen. Wir[4] haben zeigen können, daß z. B. die Allergie mit einer veränderten Ansprechbarkeit der Körperzellen vegetativen Nervenreizen gegenüber einhergeht.

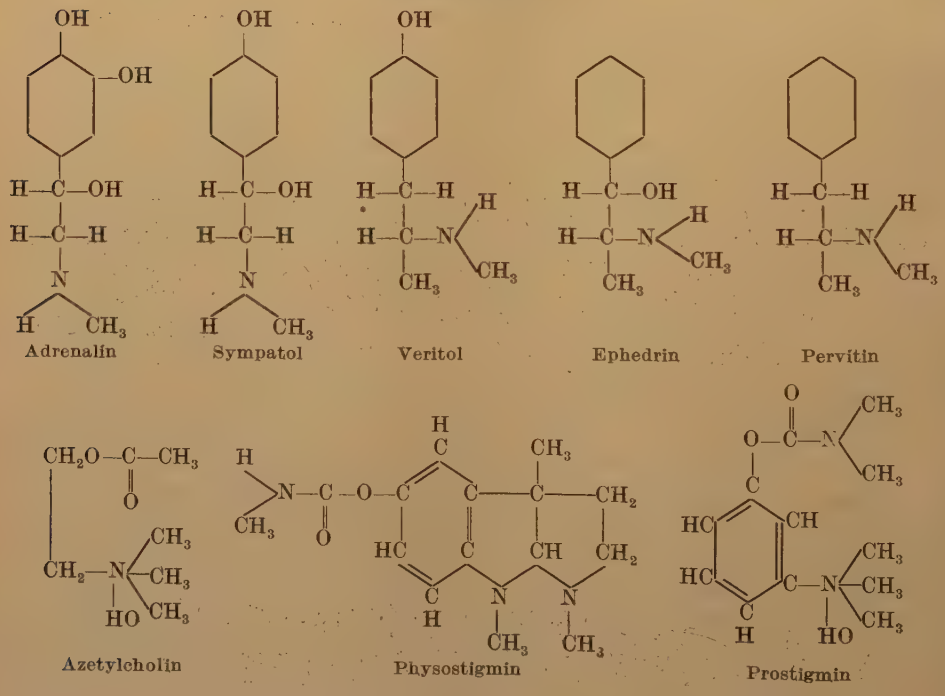
Im Physostigmin haben Loewi und Navratil[5] eine Substanz gefunden, die, wie neuere Untersuchungen von Genuit[6] gezeigt haben, schon in einer Konzentration 1 : 1000000 die Wirksamkeit der Cholinesterase vollständig aufhebt. Physostigmin bewirkt demzufolge nicht nur eine Verstärkung der Wirkungsintensität, sondern vor allem der Wirkungsdauer des Azetylcholins. In mehr unspezifischer Weise wird die Cholinesterase, wie wir[7] nachweisen konnten, durch Narkotika, besonders durch das Chloralhydrat gehemmt. Eine zusammenfassende Besprechung all der Substanzen, die das Ferment in mehr oder minder starkem Maße hemmen sollen, findet sich bei Ammon[8]. Aktivatoren der Cholinesterase von jedenfalls stärkerer Wirksamkeit sind nicht bekannt.

Wir haben in vorliegender Arbeit Substanzen untersucht, von denen eine Beeinflussung der Wirksamkeit der Aminooxydase zu erwarten war. Auf Grund der Annahme, daß auch die Aminooxydase, wie die allermeisten bisher bekannten Enzyme, eine sog. prosthetische oder aktive Gruppe besitzt, die in den kolloidalen Fermentträger eingebaut ist, kann eine Änderung der Wirksamkeit des Enzyms sowohl durch die Beeinflussung seiner aktiven Gruppen als auch über eine Änderung des physikalisch-chemischen Zustandes des kolloidalen Fermentträgers zustande kommen. Weiterhin wird eine mittelbare Beeinflussung der Wirksamkeit der Aminooxydase möglich sein durch eine Änderung der für die Fermentkatalyse optimalen Sauerstoffspannung, der Wasserstoffionenkonzentration u. a. m.

Nachdem durch die Untersuchungen von Blaschko, Richter und Schlossmann[9] festgestellt worden war, daß die Aminooxydase das Adrenalin in einen Brenzkatechinglykolaldehyd und Methylamin aufspaltet und auch andere aliphatische Amine eine Desaminierung unter Bildung von Ammoniak und eines Aldehyds erfahren, war es wichtig, den fermentativen Abbau der bekannten therapeutisch angewandten Adrenalinabkömmlinge zu untersuchen. Wir haben uns dabei auf die wichtigsten beschränkt, nämlich das Sympatol, das Adrianol, das Veritol, das Ephedrin

und das Pervitin. Diese sog. Sympathikomimetika unterscheiden sich pharmakologisch vor allem darin voneinander, daß ihre Wirkungsdauer in der Richtung Adrenalin—Adrianol—Sympatol—Veritol—Ephedrin—Pervitin zunimmt. In der gleichen Richtung nimmt ihre perorale Wirksamkeit zu und der Grad ihrer Zerstörbarkeit ab. Ein weiterer Unterschied besteht darin, daß dem Adrenalin und Sympatol jedenfalls nach den therapeutisch üblichen Einzelinjektionen eine zentralerregende Wirkung ganz fehlt, die beim Veritol angedeutet ist, beim Ephedrin schon in stärkerem Maße hervortritt und beim Benzedrin und Pervitin im Vordergrund der Wirkung steht. Während die Adrenalin- und Sympatolwirkung durch Kokain verstärkt und durch Ergotamin aufgehoben wird, ist beim Veritol, Ephedrin und Pervitin weder ein Einfluß des Kokains noch des Ergotamins zu beobachten. Diese Verschiedenheiten in der Wirkung und insbesondere in der Zerstörbarkeit müssen auf die Unterschiede der chemischen Konstitution der genannten Stoffe zurückgeführt werden. Die ersten drei Körper unserer Reihe unterscheiden sich untereinander im chemischen Aufbau der Seitenkette nicht, am Ring durch die Zahl der phenolischen OH-Gruppen. Adrenalin ist das Diphenyl-methylaminoäthanol, Sympatol das p-Oxyphenyl-methylaminoäthanol, Adrianol das o-Oxyphenyl-methylaminoäthanol. Veritol, Ephedrin und Pervitin unterscheiden sich von Adrenalin,

Strukturformeln.



Adrianol und Sympatol vor allem durch den Aufbau der Seitenkette. Sie ist um eine CH_2-Gruppe verlängert und die Methylamino-Gruppe ist nicht mehr wie bei den erstgenannten Körpern am endständigen Kohlenstoffatom substituiert. Es konnte von Blaschko[10], Mann und Quastel[11], Beyer[12] und Hauschild[13] nachgewiesen werden, daß Amine vom Typ $R — CH_2\text{-}NH_2$ leicht und Amine vom Typ $R — CHNH_2CH_3$ sehr schwer vom Körper abgebaut werden. Die Strukturformeln der genannten Körper finden sich nebenstehend.

Methodik.

Die Aminooxydaseaktivität wurde folgendermaßen bestimmt: Aus dem Schlachthof erhaltene frische Rinder- und Schweineleber wurde mechanisch zerkleinert, nach Zusatz von Quarzsand fein zerrieben, 10 Min. mit der 2—3fachen Menge eines m/15 Phosphatpuffers vom $p_H = 7{,}4$ extrahiert, der Extrakt zentrifugiert und 3—5 Stunden gegen gleichen Phosphatpuffer dialysiert. Dann wurde zur Verhinderung der fermentativen Oxydation des Adrenalins am Ring NaCN in m/200 Konzentration = m/360 HCN zugesetzt, da nach Blaschko, Richter und Schlossmann die Brenzkatechinoxydase durch Blausäure gehemmt wird. Die eigentliche Bestimmung der Aminooxydaseaktivität wurde in der Warburg-Apparatur vorgenommen. Bei dem in Tabelle 1 wiedergegebenen Versuch enthielt jedes Kölbchen im Hauptstück 5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN + m/500 Adrenalin bzw. m/500 Adrianol usw., das Ansatzstück 0,25 ccm einer 7%igen KOH-Lösung zur Absorption der Kohlensäure. Bei allen übrigen in den Tabellen dieser Arbeit wiedergegebenen Versuchen befanden sich im Hauptstück der Kölbchen 5,25 ccm Flüssigkeit, die sich zusammensetzten: In den Kontrollversuchen aus 4,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN + 1,0 ccm Aqua dest. bzw. aus 4,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN + dem in 1,0 ccm Aqua dest. gelösten Substrat (Adrenalin, Sympatol). In den eigentlichen Versuchen setzt sich der Inhalt des Hauptstücks der Kölbchen zusammen aus 4,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN + der zu untersuchenden Substanz + 1,0 ccm Aqua dest. bzw. aus 4,25 ccm Phosphatpuffer-Leber-

Tabelle 1. *Die Geschwindigkeit der fermentativen Oxydation von m/500 Adrenalin, Sympatol usw.* Warburg-Apparatur. Temperatur 37,5°. Jedes Kölbchen enthält 5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN + m/500 Adrenalin, Sympatol usw. Ein Ansatzkölbchen enthält 0,25 ccm 7% KOH. Der O_2-Eigenverbrauch des Phosphatpuffer-Leberextraktes ist von den O_2-Werten der Versuche bereits abgezogen.

5,25 ccm	O_2-Verbrauch in cmm nach		
	30 Min.	60 Min.	90 Min.
m/500 Adrenalin	46	79	109
m/500 Adrianol	37	74	106
m/500 Sympatol	35	72	105
m/500 Veritol	3	3	5
m/500 Ephedrin	3	3	4
m/500 Pervitin	0	0	0

extrakt + m/200 NaCN + der zu untersuchenden Substanz + dem in 1,0 ccm Aqua dest. gelösten Substrat. Die 1,0 ccm Substratlösung bzw. die 1,0 ccm reines H_2O wurden in ein seitliches Ansatzstück der WARBURG-Kölbchen pipettiert und nachdem diese an die Manometer angeschlossen und im Thermostat auf 37,5° erwärmt worden waren, wurde die Substratlösung bzw. das reine Lösungsmittel in die Fermentlösung einfließen lassen und mit der Ablesung an den Manometern begonnen. Nachdem BLASCHKO, RICHTER und SCHLOSSMANN festgestellt hatten, daß auf je 1 Mol verbrauchten Sauerstoff 2 Mol Methylamin entstehen, daß also zur Oxydation von 2 Mol Adrenalin 1 Mol Sauerstoff notwendig ist, haben wir in allen hier mitgeteilten Versuchen die Aminooxydaseaktivität an Hand des Sauerstoffverbrauchs pro Zeiteinheit bestimmt. Aus der Tatsache, daß der Verbrauch von 1 Mikromol Sauerstoff bei 37,5° C und 760 mm Hg Druck 25,47 cmm Sauerstoff beträgt, läßt sich unter Zugrundelegung der verwandten Substratmenge berechnen, wieviel Prozent des Substrats je Zeiteinheit fermentativ desaminiert und oxydiert wurden. In den Tabellen dieser Arbeit sind als Maß der Fermentaktivität die je Zeiteinheit verbrauchten Kubikmillimeter O_2 angegeben.

Versuche.

Als erstes haben wir die Geschwindigkeit des fermentativen Abbaues des Adrenalins, Adrianols, Sympatols, Veritols, Ephedrins und Pervitins, gemessen am O_2-Verbrauch je Zeiteinheit, bestimmt. Wie aus den in Tabelle 1 wiedergegebenen Versuchsergebnissen zu ersehen ist, wird Adrenalin am raschesten oxydiert, dann folgen Adrianol und Sympatol. Veritol, Ephedrin und Pervitin werden während einer Versuchsdauer von 1—2 Stunden von der Aminooxydase nicht angegriffen. Diese Zahlen stimmen mit den tierexperimentellen und klinischen Erfahrungen über die Wirkungsdauer der genannten Stoffe gut überein und zeigen somit, daß deren Wirkungsdauer fast ausschließlich vom Grade der fermentativen Zerstörbarkeit abhängt. Die Ergebnisse bestätigen weiterhin die von obengenannten Autoren bereits gefundene Tatsache, daß die am sekundären Kohlenstoffatom der Seitenkette substitutierten Amine für das Oxydaseferment praktisch unangreifbar sind, während die Amine vom Typ des Adrenalins, Adrianols und Sympatols, bei denen die Methylamingruppe am endständigen Kohlenstoffatom der Seitenkette substituiert ist, sehr leicht oxydiert werden.

Bei der nahen strukturellen Verwandtschaft aller von uns untersuchten Körper ist anzunehmen, daß auch Veritol, Ephedrin und Pervitin ebenso wie das Adrenalin, Adrianol und Sympatol mit den spezifischen Gruppen des Fermentes eine durch Betätigung von Nebenvalenzen adsorptive oder echte chemische Bindung eingehen, daß aber im einen Fall durch Zerfall des Substrates die Zwischenverbindung Ferment—Substrat immer wieder

gelöst und das Ferment zur erneuten Reaktion mit den Substratmolekülen frei wird, während im Fall des Ephedrins, Pervitins es zu einer dauerhaften Verbindung zwischen Substrat und Ferment kommt, die zu einer Blockierung der spezifischen Gruppen durch das unzerstörbare Substrat führt. Es wäre demzufolge anzunehmen, daß in Gegenwart von Veritol, Ephedrin und Pervitin der fermentative Abbau des Adrenalins infolge von Fermentblockierung eine Hemmung erfahren muß. In Tabelle 2 ist ein Versuch wiedergegeben, aus dem hervorgeht, daß Ephedrin noch in einer Konzentration 1 : 650000 den fermentativen Adrenalinabbau um 34% hemmt. Auch die fermentative Desaminierung des Sympatols wird durch Ephedrin in noch sehr niedrigen Konzentrationen gehemmt, wie aus Tabelle 3 zu ersehen ist. Pervitin setzt die Wirksamkeit der Aminooxydase noch in einer Konzentration 1 : 3300000 um fast 30% herab, während hohe Pervitinkonzentrationen die Fermentwirksamkeit fast vollkommen aufzuheben vermögen (Tabelle 4). Tabelle 5 zeigt die Hemmung des fermentativen Sympatolabbaues durch Pervitin. Untersucht man den Einfluß des Veritols auf den fermentativen Abbau von Adrenalin und Sympatol, so kommt man prinzipiell zu den gleichen Ergebnissen. Es seien nun Versuche angeführt, bei denen der Einfluß auch allerkleinster Veritol-, Ephedrin- und

Tabelle 2. *Die Wirkung von Ephedrin auf die fermentative Oxydation von Adrenalin.* Jedes Kölbchen enthält im Hauptstück 5,25 ccm Flüssigkeit, im Ansatzstück 0,25 ccm 7% KOH.

	O_2-Verbrauch in cmm nach 60 Min.		O_2-Verbrauchsdifferenz von Spalte 3—2	Hemmung in %
	5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN	5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN + 2,5mg Adrenalin		
ohne	50	150	100	0
Ephedrin 1 : 26 000	52	106	54	46
„ 1 : 130000	51	111	60	40
„ 1 : 650000	50	116	66	34

Tabelle 3. *Die Wirkung von Ephedrin auf die fermentative Oxydation von Sympatol.* Jedes Kölbchen enthält im Hauptstück 5,25 ccm Flüssigkeit, im Ansatzstück 0,25 ccm 7% KOH.

	O_2-Verbrauch in cmm nach 60 Min.		O_2-Verbrauchsdifferenz von Spalte 3—2	Hemmung in %
	5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN	5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN + 3 mg Sympatol		
ohne	34	118	84	0
Ephedrin 1 : 6500	36	76	40	52
„ 1 : 32500	37	95	58	31
„ 1 : 162500	34	97	63	26

Pervitinkonzentrationen untersucht wurde. Es ergab sich, daß die genannten Körper in sehr niedrigen Konzentrationen eine aktivierende Wirkung auf die Aminooxydase ausüben. Wie aus der Tabelle 6 hervorgeht, hat in Gegenwart von Veritol in einer Konzentration 1 : 8000000 bzw. 1 : 40600000 der gemessene O_2-Verbrauch gegenüber der Kontrolle um 58% bzw. 102% zugenommen. Pervitin in einer Konzentration 1 : 16500000 bewirkte eine Fermentaktivierung um 125%. Auch Ephedrinkonzentrationen über 1 : 5000000 können die Aminooxydase aktivieren. Wenn wir derartig starke Fermentaktivierungen durch niedrigste Veritol-, Ephedrin- und Pervitinkonzentrationen nicht stets finden, so mag der Grund darin zu suchen sein, daß nur in Versuchen, bei denen relativ fermentarme Organextrakte zur Anwendung kamen, die aktivierende Wirkung deutlich wurde.

Es wurde oben die Vermutung ausgesprochen, daß Veritol, Ephedrin und Pervitin die Aminooxydase hemmen, indem sie mit deren spezifischen Gruppen eine feste unlösbare Verbindung eingehen. Man kann diese Annahme durch folgenden Versuch erhärten. Es wird die Abbaugeschwindigkeit steigender Adrenalinkonzentrationen durch gleiche Fermentmengen bestimmt, und anschließend der gleiche Versuch in Gegenwart von Ephe-

Tabelle 4. *Die Wirkung von Pervitin auf die fermentative Oxydation von Adrenalin.* Jedes Kölbchen enthält im Hauptstück 5,25 ccm Flüssigkeit, im Ansatzstück 0,25 ccm 7% KOH.

	O_2-Verbrauch in cmm nach 60 Min.		O_2-Verbrauchsdifferenz von Spalte 3—2	Hemmung in %
	5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN	5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN + 2 mg Adrenalin		
ohne	70	138	68	0
Pervitin 1 : 66000	76	88	12	82
„ 1 : 330000	73	117	44	35
„ 1 : 650000	70	120	50	28

Tabelle 5. *Die Wirkung von Pervitin auf die fermentative Oxydation von Sympatol.* Jedes Kölbchen enthält im Hauptstück 5,25 ccm Flüssigkeit, im Ansatzstück 0,25 ccm 7% KOH.

	O_2-Verbrauch in cmm nach 60 Min.		O_2-Verbrauchsdifferenz von Spalte 3—2	Hemmung in %
	5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN	5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN + 3 mg Sympatol		
ohne	82	220	138	0
Pervitin 1 : 13200	80	127	47	66
„ 1 : 66000	83	178	95	31
„ 1 : 330000	82	193	111	20

drin oder Pervitin wiederholt. Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, ergaben sich für kleine und mittlere Adrenalinkonzentrationen eine fast lineare Abhängigkeit der Abbaugeschwindigkeit von der Adrenalinkonzentration. Erst bei größeren Substratmengen nimmt die Abbaugeschwindigkeit im Verhältnis zur zugesetzten Substratmenge ab. Wie nun aus der gleichen Tabelle weiter hervorgeht, ist der hemmende Einfluß einer bestimmten Ephedrin- oder Pervitinmenge bei niedrigen Adrenalinkonzentrationen ein prozentual größerer als bei höheren. Pervitin in einer Konzentration von 1: 660 000 wirkt nur in Gegenwart kleiner Adrenalinmengen fermenthemmend. Der Abbau mittlerer Substratmengen wird durch das Pervitin

Tabelle 6. *Die aktivierende Wirkung kleinster Veritol- und Pervitinmengen auf die fermentative Oxydation von Adrenalin.*

Jedes Kölbchen enthält im Hauptstück 5,25 ccm Flüssigkeit, im Ansatzstück 0,25 ccm 7% KOH.

	O_2-Verbrauch in cmm nach 30 Min.			
	5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN	5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN + 2,5 mg Adrenalin	O_2-Verbrauchsdifferenz von Spalte 3—2	Aktivierung in %
ohne	53	76	23	0
Veritol 1: 325000	51	75	24	2
„ 1: 1625000	50	76	26	13
„ 1: 8125000	54	90	36	58
„ 1: 40625000	55	102	47	102
ohne	51	71	20	0
Pervitin 1: 660000	53	77	24	23
„ 1: 3300000	54	86	32	61
„ 1: 16500000	53	97	44	125

Tabelle 7. *Die Abhängigkeit der Hemmungswirkung von Ephedrin und Pervitin von der Substratkonzentration.*

Warburg-Apparatur. Temperatur 37,5°. Jedes Kölbchen enthält im Hauptstück 5,25 ccm Flüssigkeit, im Ansatzstück 0,25 ccm 7% KOH. Der O_2-Eigenverbrauch des Phosphatpuffer-Leberextraktes (in 60 Min. 136 cmm O_2) ist von den O_2-Verbrauchswerten der Versuche bereits abgezogen.

	O_2-Verbrauch in cmm nach 60 Min.				
	5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN	in Gegenwart von m/500 Ephedrin Hemmung in %	in Gegenwart von m/1000 Pervitin Hemmung in %	in Gegenwart von m/20000 Pervitin Änderung in %	
Adrenalin m/125	172	17	25	20	Aktivierung
„ m/190	142	25	24	6	„
„ m/250	126	36	32	2	„
„ m/500	80	50	41	0	„
„ m/1000	47	53	45	10	Hemmung
„ m/2000	24	64	37	26	„

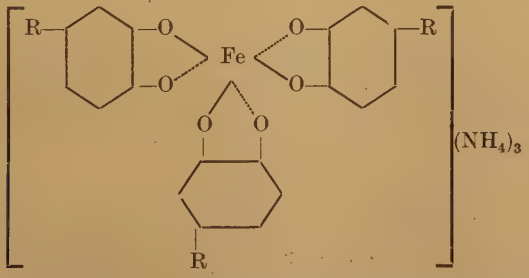
kaum beeinflußt und in Gegenwart hoher Adrenalinkonzentrationen wirkt das Pervitin in diesem Versuch sogar im aktivierenden Sinne auf das Enzym. Die Erklärung dieser Befunde ist folgende: Setzt man einer ferment- und substrathaltigen Lösung einen Hemmungsstoff zu, so wird der Grad der Hemmung unabhängig von der Substratkonzentration immer dann der gleiche sein, wenn nicht der Hemmungsstoff mit dem Substrat in Konkurrenz um die aktiven Gruppen des Enzyms tritt. Im anderen Falle aber wird auf Grund des Massenwirkungsgesetzes das Verhältnis der molaren Konzentrationen von Substrat und Hemmungsstoff zueinander den jeweiligen Grad der Hemmung wesentlich mitbestimmen. Bei gleichbleibender Konzentration des Hemmungsstoffes wird mit Erhöhung der Substratkonzentration die Hemmungswirkung prozentual abnehmen. Der Versuch, in dem die Pervitinkonzentration von 1 : 660 000 in Gegenwart niedriger Adrenalinkonzentration fermenthemmend und in Gegenwart höherer Adrenalinkonzentration aktivierend wirkte, lehrt uns, daß für die Frage, ob z. B. Pervitin in einer bestimmten Konzentration einen hemmenden oder aktivierenden Einfluß ausübt, nicht so sehr die absolute molare Konzentration bestimmend zu sein scheint, als vielmehr das Verhältnis der Pervitin- zur Adrenalinkonzentration. Vielleicht hat man die Ursache der fermentaktivierenden Wirkung kleinster Veritol-, Ephedrin- und Pervitinkonzentrationen im Gegensatz zu der hemmenden größerer Mengen darin zu suchen, daß kleinste Konzentrationen zwar dazu ausreichen, bestimmte, in dem Organextrakt vorhandene, die Aminooxydasewirksamkeit hemmende Moleküle zu blockieren, daß aber höhere Konzentrationen notwendig sind, um die spezifischen Gruppen der Aminooxydase auszuschalten.

Auf Grund dieser Untersuchungen kommen wir zu neuen Vorstellungen vom Wirkungscharakter der Amine vom Typ des Veritol, Ephedrin und Pervitin. Diese Körper wirken wahrscheinlich nicht wie das Adrenalin selbst als Sympathikusreizstoffe, sondern sie verhindern die rasche Zerstörung des vom sympathischen Nervensystem gebildeten bzw. des hormonalen Adrenalins und erhöhen dadurch dessen Wirksamkeit. Da sie selbst fermentativ nicht oder sehr langsam abgebaut werden, ist ihre Wirkung von langer Dauer.

Das an Stelle des Adrenalins therapeutisch viel verwandte Sympatol und ebenso das dem Sympatol isomere Adrianol werden, wie wir bereits in Tabelle 1 zeigen konnten, von der Aminooxydase ebenfalls sehr rasch zerstört. Sie stehen auch hinsichtlich ihrer übrigen pharmakologischen Eigenschaften dem Adrenalin viel näher als dem Ephedrin und Pervitin. Es erhebt sich deshalb die Frage, ob diese Stoffe in ihrem Wirkungscharakter dem Adrenalin zuzuordnen sind und somit als echte Sympathikusreizstoffe anzusehen sind, oder nach Einbringung in den Körper bis zu ihrer Zerstörung mit dem körpereigenen Adrenalin in Konkurrenz um das Fermentmolekül treten und somit den Abbau des körpereigenen Adrenalins zeitweise

und teilweise behindern. Entsprechende von uns durchgeführte Versuche haben ergeben, daß bei Zugabe kleinerer und mittlerer Sympatolmengen diese ohne Verzögerung des Adrenalinabbaues neben diesem mit abgebaut werden. Wird aber durch die Zugabe großer Sympatolmengen die maximale Leistungsfähigkeit der Enzymlösung überschritten, dann hemmen sich beide Stoffe gegenseitig im Abbau. Da das Verhältnis Enzym- zur Substratmenge im tierischen Organismus in keiner Weise den Versuchsbedingungen entspricht, sondern die Enzymmenge weit die Substratmenge überwiegen wird, muß man annehmen, daß das therapeutisch zugeführte Sympatol — auch in der praktisch stets angewandten hohen Dosis von 60 mg — den fermentativen Abbau des körpereigenen Adrenalins niemals hemmen wird. Es ist deshalb die Wirkung des Sympatols, Adrianols und chemisch nahestehender Verbindungen qualitativ der des Adrenalins gleichzusetzen. Sie sind also als Sympathikusreizstoffe anzusehen.

Untersucht man das am Ring oxydierte Adrenalin, das dabei bekanntlich in ein Chinon, einen roten Farbstoff übergeht und seine ursprüngliche pharmakologische Wirksamkeit verliert, so findet man, daß es ebenso rasch an der Seitenkette oxydiert wird, wie die Ausgangssubstanz. Gibt man zum Adrenalin Eisenchlorid und Ammoniak, so entsteht eine Komplexverbindung relativer Haltbarkeit folgender Konstitution, in der die



phenolischen OH-Gruppen blockiert sind. Auch diese Verbindung wird an den Seitenketten durch die Aminooxydase mit der gleichen Geschwindigkeit wie das freie Adrenalinmolekül desaminiert und oxydiert. Es besteht also kein Zweifel, daß die phenolischen OH-Gruppen, die für die rasch einsetzende und intensive Wirkung des Adrenalins verantwortlich zu machen sind, für den fermentativen Abbau der Seitenkette ohne Bedeutung sind. In diesem Sinne spricht auch die Tatsache, daß Adrenalin, Adrianol und Sympatol an den Seitenketten fast gleich schnell oxydiert werden, während sich z. B. die Wirkungsmengen des Adrenalins zum Sympatol wie 1 : 100 verhalten und auch hinsichtlich der Geschwindigkeit des Wirkungseintrittes und der Wirkungsdauer erhebliche Unterschiede zwischen beiden Substanzen bestehen, die sich im Aufbau der Seitenkette nicht und am Ring nur durch das Fehlen einer OH-Gruppe unterscheiden.

Wir haben bereits einleitend darauf hingewiesen, daß die zentralerregende Wirkung der von uns untersuchten Stoffe mit deren Wirkungsdauer zunimmt, während ihre fermentative Zerstörbarkeit im gleichen Maße abnimmt. Man wird deshalb zwischen dieser und den letzteren Eigenschaften einen ursächlichen Zusammenhang annehmen dürfen. Auf Grund des bisher Gesagten wird man die zentralerregende Wirkung des Veritols, Ephedrins und Pervitins darauf zurückführen müssen, daß diese Substanzen in vivo die rasche Zerstörung des körpereigenen Adrenalins hemmen, so daß nach dieser Vorstellung die eigentliche erregende Wirkung dem im Körper gebildeten nervösen oder hormonalen Adrenalin zukommt. Sie wird um so stärker sein, je nachhaltiger die Adrenalinzerstörung in vivo gehemmt wird. Wenn man nach therapeutischen Einzelinjektionen von Adrenalin sowohl klinisch als auch im Tierexperiment eine stimulierende Wirkung wenig beobachtete, so liegt der Grund wohl darin, daß das Bild der peripheren Sympathikusreizwirkung ganz im Vordergrund der therapeutischen Adrenalinwirkung steht und daß zweitens die nur wenige Minuten anhaltende Adrenalinwirkung therapeutischer Dosen wohl zu kurz ist, um z. B. beim Menschen eine Zunahme der intellektuellen und physischen Leistungsfähigkeit, eine Abnahme der Ermüdbarkeit und des Schlafbedürfnisses u. ä. m. mit Sicherheit nachweisen zu können. Andererseits ist bekanntlich der Zustand des Wachseins und der Tätigkeit gegenüber dem Schlafzustand gekennzeichnet durch ein Überwiegen des Sympathikustonus über den Vagustonus, und ein essentieller oder künstlich erzeugter Sympathikustonus erschwert in jedem Falle das Zustandekommen des natürlichen und des künstlich erzeugten Schlafes und das der Narkose ebenso.

Es läßt sich ein dem physiologisch gesteigerten Sympathikustonus analoger Zustand experimentell nur durch eine genau ausdosierte intravenöse oder besser intraarterielle vielstündige Adrenalindauerinfusion erzeugen. Eine derartige Dauerinfusion des Sympathikusüberträgerstoffs geht mit größter Wahrscheinlichkeit einher mit einer zentral erregenden Wirkung, wie wir sie nach Anwendung der Pharmaka vom Typ des Benzedrins, Pervitins und Ephedrins sehen. Man wird von diesen Körpern deshalb eine besonders ausgeprägte zentral erregende Wirkung erwarten dürfen, weil durch sie der fermentative Abbau des körpereigenen Adrenalins in allen aminooxydasehaltigen Organen und so auch im Zentralnervensystem selbst, das, wie wir einleitend betonten, neben Leber und Niere besonders oxydasereich ist, gehemmt wird.

Von besonderer Bedeutung für die Wirksamkeit der Enzyme ist die Wasserstoffionenkonzentration. Die Aktivität der allermeisten Fermente zeigt ein p_H-Optimum und sowohl eine Änderung des p_H nach der einen, als auch nach der anderen Seite führt zur Abschwächung und zum Verlust der Wirksamkeit. Die gesamten dynamischen und Stoffwechselvor-

gänge, die mit gesteigerter Muskeltätigkeit einhergehen, haben sehr viel Ähnlichkeit mit den Kreislauf- und Stoffwechselwirkungen des Adrenalins. Man wird nach den neueren Untersuchungen von REIN und seinen Schülern[15], GREMELS[16] u. a. das sympathikogene und hormonale Adrenalin als den Stoff ansehen müssen, dessen Wirksamwerden erst die kreislaufphysikalischen und energetischen Voraussetzungen schafft für die Möglichkeit gesteigerter Muskeltätigkeit. Nun beträgt nach älteren Angaben das p_H des Muskels etwa 6,0, nach neueren Untersuchungen von P. ROUS[17] und FISKE und SUBBAROW[18] 5,6. Nach anderen neueren Angaben[35] liegt das p_H des ruhenden Muskels zwischen 7,05 und 7,38. Es sollen vor allem beim Zerfall des Phosphorkreatins frei werdende basische Valenzen die Milchsäure bis zu 230 mg-% zu neutralisieren vermögen, was allerdings nur bei einer im Muskel herrschenden sauren Reaktion in höherem Maße möglich ist (FISKE und SUBBAROW[18]). Man wird also zumindest im arbeitenden Muskel ein p_H unter 7,0 annehmen dürfen. Die Milchsäurekonzentrationen im arbeitenden Muskel können sehr hoch sein. Sie sollen nach den Untersuchungen von SACKS[19] das 10fache, nach den Angaben von JOKL[20] das 4—5fache der im abfließenden Blut gefundenen Milchsäurewerte betragen, die bei schwerer Muskelarbeit auf 200 mg-% und darüber ansteigen können. Nach neuesten Angaben[36, 37] soll Milchsäure als Zwischenprodukt im Glykogenabbau des Muskels überhaupt nicht entstehen und die Anwesenheit größerer Milchsäuremengen im Blut sei als Folge eines O_2-Mangels anzusehen. Da aber sowohl im arbeitenden isolierten Muskel als auch beim im Gesamtorganismus arbeitenden Muskel stets erhöhte Milchsäurewerte gefunden werden, so muß eine relative Asphyxie bei stärkerer Arbeit allgemein recht häufig sein.

Es erschien uns nun sehr wichtig zu untersuchen, ob die Milchsäure selbst oder die durch sie geschaffene sauere Reaktion im Muskelgewebe imstande sind, den Wirkungsgrad der Aminooxydase und somit die Geschwindigkeit des Adrenalinabbaues im Muskel wesentlich zu verändern. In Gegenwart von milchsauren Salzen ist, wie wir durch Versuche feststellen konnten, die Geschwindigkeit des fermentativen Abbaues des Adrenalins kaum verändert. Setzt man dagegen freie Milchsäure dem gepufferten fermenthaltigen Leberextrakt zu, und zwar in Konzentrationen, wie sie im ruhenden und arbeitenden Muskel zu finden sind, so kommt es, wie aus Tabelle 8 hervorgeht, zu p_H-Verschiebungen bis zu $p_H = 5{,}6$, also innerhalb eines Bereiches, den man auf Grund der oben angegebenen empirisch gefundenen p_H-Werte für das Muskelgewebe als durchaus physiologisch ansehen kann. Der Einfluß der durch die Zugabe der Milchsäure hervorgerufenen p_H-Verschiebungen auf die Wirksamkeit der Aminooxydase ist ein sehr großer, wie aus der Tabelle 8 hervorgeht. Da sowohl die von uns angewandten Milchsäurekonzentrationen als auch die durch den Milchsäurezusatz hervorgerufenen p_H-Verschiebungen innerhalb der

Grenzen der die Muskelarbeit begleitenden Änderungen liegen, ist anzunehmen, daß auch in vivo das als Sympathikusüberträgerstoff gebildete und das hormonale Adrenalin im arbeitenden Muskel wesentlich langsamer zerstört werden als normalerweise. Vielleicht ist die mit starker Muskelarbeit einhergehende Sympathikotonie nicht nur auf einer vermehrten Bildung von Adrenalin bzw. Abgabe von hormonalem Adrenalin, sondern ebenso auf eine verminderte Adrenalinzerstörung — und dieser Mechanismus wäre der ökonomischere — in der quergestreiften Muskulatur zurückzuführen. Da ein erhöhter Sympathikustonus eine weitere Steigerung der Verbrennungsvorgänge in allen Körperzellen und auch der quergestreiften Muskulatur zur Folge hat, kann die Zunahme des Sauerstoffbedarfs im Körper leicht zu einer unzureichenden O_2-Versorgung der arbeitenden Muskulatur führen. Dieser Sauerstoffmangel bewirkt eine weitere Erhöhung des Milchsäurespiegels im Muskel und führt zu einer weiteren Verschiebung der aktuellen Reaktion nach der sauren Seite hin. Sie wiederum bewirkt eine noch stärkere Hemmung des Adrenalinabbaues durch die Aminooxydase. So kann auf dem Wege eines Circulus vitiosus eine Erschöpfungssympathikotonie entstehen, ein Zustand, den H. GREMELS[21] z. B. am isolierten Warmblüterherzen durch Ausschaltung des Vagus bzw. durch Dauerinfusion größerer Adrenalinmengen experimentell erzeugen konnte.

Zweifellos wird für die Wirksamkeit der Aminooxydase als Sauerstoff übertragenden Fermentes die im Gewebe herrschende O_2-Spannung von erheblicher Bedeutung sein. Wir konnten die Angaben von BLASCHKO, RICHTER und SCHLOSSMANN bestätigen, daß in reiner Sauerstoffatmosphäre die Wirksamkeit der Aminooxydase um das 2—3fache erhöht ist. Da in der lebenden Körperzelle ständig eine große Zahl fermentativer Oxyda-

Tabelle 8. *Die Wirkung von Milchsäure auf das p_H des Phosphatpuffer-Leberextraktes und die fermentative Oxydation von Adrenalin.*

WARBURG-Apparatur. Temperatur 37,5°. Jedes Kölbchen enthält im Hauptstück 5,25 ccm Flüssigkeit, im Ansatzstück 0,25 ccm 7% KOH.

	p_H	O_2-Verbrauch in cmm nach 60 Min.		O_2-Verbrauchsdifferenz von Spalte 3—2	Hemmung in %
		5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN	5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN + 2,5 mg Adrenalin		
ohne	7,88	50	140	90	0
Milchsäure 450 mg-%	5,94	137*	137	0	100
„ 225 mg-%	7,0	107*	127	20	78
„ 100 mg-%	7,23	95*	135	40	55
„ 45 mg-%	7,56	83*	143	60	33
„ 9 mg-%	7,78	72*	136	64	29

* Die hohen O_2-Verbrauchswerte sind durch die teilweise Oxydation der Milchsäure bedingt.

tionen abläuft, so ist anzunehmen, daß sich neben der Aminooxydase andere Oxydationsfermente und leicht oxydierbare Stoffe um den vorhandenen Sauerstoff bewerben und so auf die Wirksamkeit der Aminooxydase von Einfluß sein können. Wie aus der Tabelle 9 hervorgeht, wird z. B. in Gegenwart von Zystein, das in alkalischem Milieu unter Sauerstoffverbrauch in Zystin übergeht, die Wirksamkeit der Aminooxydase gehemmt. Umgekehrt erzielt man durch Hinzufügung von Metalloxyden, die ihren Sauerstoff leicht abgeben, eine Aktivierung des Enzyms. Ein entsprechender Versuch mit Natriumtellurid, das im alkalischen Milieu unter Sauerstoffabgabe leicht in metallisches Tellur übergeht, ist in Tabelle 10 wiedergegeben. Durch entsprechende Kontrollversuche haben wir festgestellt, daß die Oxydation einer 0,05%igen Adrenalin-Phosphatpufferlösung vom p_H 7,4 in Abwesenheit der Aminooxydase durch Natrium-

Tabelle 9. *Die Wirkung von Cystein auf die fermentative Oxydation von Adrenalin.* WARBURG-Apparatur. Temperatur 37,5°. Jedes Kölbchen enthält im Hauptstück 5,25 ccm Flüssigkeit, im Ansatzstück 0,25 ccm 7% KOH.

	O_2-Verbrauch in cmm in 120 Min.			
	5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN	5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN + 3 mg Adrenalin	O_2-Verbrauchsdifferenz von Spalte 3—2	Hemmung in %
ohne	121	278	157	0
Cystein 0,09% . . .	175*	291	116	26
„ 0,018% . . .	169*	291	122	22
„ 0,0036% . .	156*	281	125	20

* Die hohen O_2-Verbrauchswerte sind bedingt durch die Oxydation des Cysteins zu Cystin in alkalischem Milieu durch den Sauerstoff der Luft.

Tabelle 10. *Die Wirkung von Natriumtellurit auf die fermentative Oxydation von Adrenalin.*

WARBURG-Apparatur. Temperatur 37,5°. Jedes Kölbchen enthält im Hauptstück 5,25 ccm Flüssigkeit, im Ansatzstück 0,25 ccm 7% KOH.

	O_2-Verbrauch in cmm nach 60 Min.			
	5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN	5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN + 2,5 mg Adrenalin	O_2-Verbrauchsdifferenz von Spalte 3—2	Aktivierung in %
ohne	105	167	62	0
Natriumtellurit 0,2% .	44*	118	74	20
„ 0,05% .	56*	133	77	24
„ 0,0125%	71*	151	80	30
„ 0,006%	91*	176	85	38
„ 0,0015%	100	167	67	8

* Die niedrigen O_2-Verbrauchswerte sind bedingt durch den teilweisen Ersatz des Luftsauerstoffs durch den bei der Reduktion des Te_2O_3 frei werdenden Sauerstoffs.

Tellurid in Konzentrationen, wie sie von uns in dem in Tabelle 10 wiedergegebenen Versuch angewandt wurden, nicht beschleunigt, sondern eher vermindert ist, da zur Oxydation des Adrenalins der bei der Reduktion des Telluroxyds frei werdende Sauerstoff verbraucht wird. Man wird also annehmen müssen, daß in Gegenwart von Natriumtellurid Adrenalin nicht unmittelbar, sondern unter Zwischenschaltung eines Oxydationsfermentes beschleunigt oxydiert wird.

Wie besonders WELS[22] zeigen konnte, nimmt z. B. die Oxydations- und Reduktionsfähigkeit der Haut nach Ultraviolettbestrahlung in hohem Maße zu. Man wird annehmen müssen, daß das Ultraviolettlicht eine Aktivierung von Oxydations- und Reduktionskatalysatoren und so auch eine Aktivierung entsprechender Fermente bewirkt. Wir konnten durch Ultraviolettbestrahlung unserer Leberextrakte die Wirksamkeit der darin enthaltenen Aminooxydase erheblich steigern. Wir benutzten zur Bestrahlung eine Bogenlampe. Die bestrahlte Lösung befand sich in 25 cm Abstand vom Brennpunkt. In Tabelle 11 ist ein Versuch angeführt, bei dem nach einer Bestrahlungszeit von 60 Min. sofort mit der Bestimmung der Oxydaseaktivität, d. h. mit der Bestimmung des fermentativen Adrenalinabbaues begonnen wurde. Es zeigte sich, daß der aktivierende Einfluß der Ultraviolettbestrahlung erst 2 Stunden nach Beendigung der Bestrahlung am intensivsten war. Doch geht die durch Bestrahlung zu erzielende Fermentaktivierung auch relativ rasch wieder vorüber, wie uns ein anderer Versuch zeigte. Es wurde in diesem in Tabelle 12 wiedergegebenen Versuch mit der Aktivitätsbestimmung eines 45 Min. lang bestrahlten Leberextraktes erst $1^1/_2$ Stunden nach Beendigung der Bestrahlung begonnen. Innerhalb der ersten 15 Min. des Versuchs ergab sich eine Erhöhung der Wirk-

Tabelle 11 *Die Änderung der Aminooxydaseaktivität eines ultraviolettbestrahlten Phosphatpuffer-Extraktes.*

WARBURG-Apparatur. Temperatur 37,5°. Jedes Kölbchen enthält im Hauptstück 5,25 ccm Flüssigkeit, im Ansatzstück 0,25 ccm 7% KOH. Der O_2-Eigenverbrauch des Phosphatpuffer-Leberextraktes ist von den O_2-Verbrauchswerten der Versuche bereits abgezogen.

	O_2-Verbrauch in cmm				
nach Minuten	5,25 ccm unbestrahlter Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN	5,25 ccm unbestrahlter Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN + 5 mg Adrenalin nach Abzug der O_2-Verbrauchswerte der Spalte 2	5,25 ccm bestrahlter Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN	5,25 ccm bestrahlter Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN + 5 mg Adrenalin nach Abzug der O_2-Verbrauchswerte der Spalte 4	
30	30	89	35	81	% Hemmung
60	50	143	53	190	33% Aktivierung
90	64	184	67	263	43% „
120	75	214	75	314	46% „

samkeit des bestrahlten Organextraktes gegenüber dem unbestrahlten um 191%, nach 30 Min. nur noch um 93% und schließlich nach 1 Stunde um 50%. Durch Ultraviolettbestrahlung von aminooxydasehaltigen Organextrakten hat man also die Möglichkeit der Erzielung einer starken, wenn auch vorübergehenden Aktivierung dieses Enzyms. Zur Erklärung der Lichtwirkung wird man an eine Abgabe von Quantenenergie an die Elektronenhüllen der Atomgruppen des Enzymmoleküls zu denken haben, die mit dem Substrat unmittelbar reagieren. Dieser vom Lichtquant abgegebene Energiezuwachs verleiht wohl den spezifischen Enzymgruppen die Fähigkeit einer vorübergehend gesteigerten Wirksamkeit.

Wir haben bereits einleitend darauf hingewiesen, daß sich aus dem Aufbau der Enzyme aus einer spezifischen Gruppe und einem kolloidalen Träger von Eiweißnatur im wesentlichen zwei Möglichkeiten der Beeinflussung der Enzymwirksamkeit ergeben. In den bisher mitgeteilten Versuchen war die Änderung der Fermentaktivität stets als die Folge einer veränderten Reaktionsfähigkeit der spezifischen Gruppen des Enzyms angesehen worden. In den folgenden Versuchen haben wir die Wirksamkeit der Aminooxydase in Gegenwart von Substanzen untersucht, von denen wir annehmen dürfen, daß sie einen Einfluß auf die spezifischen Enzymgruppen nicht besitzen, aber den physikalisch chemischen Zustand des kolloidalen Fermentträgers zu beeinflussen vermögen. Es handelt sich einerseits um einige Körper aus der Gruppe der Narkotika und andererseits um den Harnstoff. Von KOCHMANN[23] ist der Nachweis erbracht worden, daß die allermeisten Narkotika in niedrigen Konzentrationen auf reine Eiweißkörper und auf Gewebsproteine in geringem Maße quellungs-

Tabelle 12. *Die Änderung der Aminooxydaseaktivität eines 45 Min. ultraviolettbestrahlten Phosphatpuffer-Leberextraktes. Beginn der Aminooxydaseaktivitätsbestimmung 90 Min. nach Beendigung der Bestrahlung.*

WARBURG-Apparatur. Temperatur 37,5°. Jedes Kölbchen enthält im Hauptstück 5,25 ccm Flüssigkeit, im Ansatzstück 0,25 ccm 7% KOH. Der O_2-Eigenverbrauch des Phosphatpuffer-Leberextraktes ist von den O_2-Verbrauchswerten der Versuche bereits abgezogen.

	O_2-Verbrauch in cmm				
nach Minuten	5,25 ccm unbestrahlter Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN	5,25 ccm unbestrahlter Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN + 2,5 mg Adrenalin nach Abzug der O_2-Verbrauchswerte der Spalte 2	5,25 ccm bestrahlter Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN	5,25 ccm bestrahlter Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN + 2,5 mg Adrenalin nach Abzug der O_2-Verbrauchswerte der Spalte 4	
15	10	11	13	32	191% Aktivierung
30	20	35	24	45	93% „
60	33	43	38	64	50% „

fördernd und in höheren Konzentrationen zunehmend entquellend wirken. Diese Befunde sind durch zahlreiche andere Untersuchungen in vieler Hinsicht bestätigt worden. Es ist von einer größeren Anzahl von Fermenten bekannt, daß ihre Wirksamkeit durch Narkotikazusätze gehemmt werden kann. Wir haben gemeinsam mit FAHR[24] und gemeinsam mit ROHDE[25] zeigen können, daß die Aktivität der Cholinesterase durch niedrige Narkotikakonzentrationen eine geringe Zunahme erfährt, während höhere Narkotikakonzentrationen die Wirksamkeit der Cholinesterase in zunehmendem Maße hemmen. Wir sind dabei zu der Auffassung gekommen, daß niedrigste Narkotikakonzentrationen deshalb, weil sie auf Proteine hydratationssteigernd und quellungsfördernd wirken, auch die Wirksamkeit von Fermenten erhöhen müssen und daß höhere Narkotikakonzentrationen deshalb in steigendem Maße die Fermentaktivität hemmen, weil durch eine Abnahme des Hydratationsgrades, des Quellungszustandes und der Oberflächeneigenschaften des kolloidalen Fermentträgers die Wirksamkeit des Gesamtferments eine Minderung erfahren muß. Wir haben nun gesehen, daß ebenso wie die Aktivität der Cholinesterase auch die der Aminooxydase durch niedrigste Narkotikakonzentrationen gesteigert und durch höhere herabgesetzt wird. Wie aus Tabelle 13 hervorgeht, wird durch höhere Chloralhydratkonzentrationen die Aminooxydase stark gehemmt, während niedrige Konzentrationen einen aktivierenden Einfluß ausüben, der bis zu 40% beträgt. Aus Tabelle 14 ersehen wir, daß auch der Amylalkohol eine stark hemmende Wirkung auf das Ferment ausübt. Wenn auch diese Versuche in erster Linie dartun sollten, daß eine Änderung des physikalisch-chemischen Zustandes des kolloidalen Anteils

Tabelle 13. *Die Wirkung von Chloralhydrat auf die fermentative Oxydation von Adrenalin.*

WARBURG-Apparatur. Temperatur 37,5°. Jedes Kölbchen enthält im Hauptstück 5,25 ccm Flüssigkeit, im Ansatzstück 0,25 ccm 7% KOH.

	O_2-Verbrauch in cmm nach 60 Min.		O_2-Verbrauchsdifferenz von Spalte 3—2	
	5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN	5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN + 2,5 mg Adrenalin		
ohne	88	183	95	
Chloralhydrat 520 mg-%	80	95	15	84% Hemmung
„ 340 mg-%	81	103	22	76% „
„ 170 mg-%	86	137	51	46% „
„ 85 mg-%	86	179	93	2% „
„ 42 mg-%	70	175	105	11% Aktivierung
„ 8 mg-%	85	218	133	40% „
„ 1,6 mg-%	88	202	114	20% „
„ 0,3 mg-%	86	191	105	10% „

des Ferments mit einer entsprechenden Änderung der Enzymwirksamkeit verbunden ist, so geben sie andererseits einen Hinweis darauf, daß in Gegenwart von Narkotika der fermentative Abbau der Überträgerstoffe des vegetativen Nervensystems und somit die gesamte Regulationsfunktion des vegetativen Systems erheblich gegenüber der Norm verändert sein kann, unabhängig davon, ob man einen durch die Narkotika verursachten beschleunigten oder verlangsamten Abbau des körpereigenen Adrenalins und Azetylcholins annimmt.

Durch Untersuchungen von Pauli[26], Beck und Schormüller[27], F. Heim[28] u. a. konnte der Nachweis erbracht werden, daß Harnstoff die Quellung und Hydratation, die Löslichkeit und den Stabilitäts- und Dispersitätsgrad von Kolloiden, insbesondere von Eiweißkörpern erhöht. Nach W. Pauli wird durch den Harnstoff die Einlagerung von Wasser in den Molekularkomplex des Kolloids begünstigt. Dieser Vorgang führt zu einer Auflockerung der Mizellenstruktur des kolloidalen Molekularkomplexes. Im extremen Fall kann die durch Harnstoff erzwungene Einlagerung von Wassermolekülen in die Eiweißmizelle soweit gehen, daß die Molkohäsion gesprengt wird und der ursprünglich große Molekularkomplex in kleinere zerfällt. So konnten William und Watson[29], Burck und Greenberg[30] zeigen, daß in konzentrierteren Harnstofflösungen das Molekulargewicht verschiedener Eiweißkörper nur die Hälfte bis $^1/_{10}$ des normalen, d. h. des in wäßriger Lösung bestimmten beträgt. In Tabelle 15 ist ein Versuch wiedergegeben, der den Einfluß verschieden hoher Harnstoffkonzentrationen auf die Wirksamkeit der Aminooxydase aufzeigt. Während niedrige Harnstoffkonzentrationen einen geringen aktivierenden Einfluß auf das Ferment ausüben, nimmt in Gegenwart höherer Konzentrationen die Fermentaktivität ab, und in Konzentrationen über 20% sehen

Tabelle 14. *Die Wirkung von Amylenhydrat auf die fermentative Oxydation von Adrenalin.*

Warburg-Apparatur. Temperatur 37,5°. Jedes Kölbchen enthält im Hauptstück 5,25 cm Flüssigkeit, im Ansatzstück 0,25 ccm 7% KOH.

	O_2-Verbrauch in cmm nach 60 Min.			
	5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN	5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN + 2,5 mg Adrenalin	O_2-Verbrauchsdifferenz von Spalte 3—2	
ohne	139	210	71	
Amylenhydrat 430 mg-%	128	152	24	66% Hemmung
„ 180 mg-%	129	172	43	40% „
„ 110 mg-%	134	185	51	29% „
„ 33 mg-%	139	201	62	13% „
„ 21 mg-%	139	208	69	3% „
„ 7 mg-%	141	217	76	7% Aktivierung

wir eine totale Hemmung. Entfernt man durch Dialyse den Harnstoff, so gewinnt das Ferment seine Wirksamkeit wenigstens zu einem kleinen Teil wieder zurück. Diese Beobachtungen über den Einfluß des Harnstoffs auf die Aktivität der Aminooxydase stehen in guter Übereinstimmung mit unseren Kenntnissen von den physikalisch-chemischen Eigenschaften dieser Substanz. In niedrigen, hydratationssteigernden und quellungsfördernden Konzentrationen aktiviert Harnstoff das Ferment, höhere Harnstoffkonzentrationen bewirken eine partielle, und sehr hohe Harnstoffkonzentrationen, die, wie erwähnt, den kolloidalen Fermentkomplex zu sprengen imstande sind, eine totale Hemmung. Die hohe Reversibilität der Harnstoffwirkung, auf die wir[31] bereits früher hingewiesen haben, erklärt die durch Dialyse zu erzielende teilweise Wiedergewinnung der Fermentwirksamkeit.

Die Versuche, die zur Bestimmung der Aktivität der Aminooxydase in Gegenwart verschieden hoher Harnstoff- und Narkotikakonzentrationen angestellt worden waren, haben in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen von uns über den Einfluß dieser Stoffe auf die Wirksamkeit der Cholinesterase ergeben, daß ein integrierender Bestandteil dieser Enzyme ein Eiweißkörper sein muß, von dessen jeweiligen physikalisch-chemischen Zustand die Wirksamkeit des Gesamtfermentes wesentlich mitbestimmt wird. Die Versuche haben weiterhin gezeigt, daß Änderungen des physikalisch-chemischen Zustandes der Zell- und Gewebskolloide die Geschwindigkeit fermentativer Prozesse in hohem Maße zu beeinflussen vermögen, und zwar wird mit einer Erhöhung des Hydratations- und Quellungszustandes wohl meist eine Wirksamkeitssteigerung und mit einer Dehydratation und Entquellung eine Abnahme der enzymatischen Wirksamkeit verbunden sein.

Tabelle 15. *Die Wirkung von Harnstoff auf die fermentative Oxydation von Adrenalin.* WARBURG-Apparatur. Temperatur 37,5°. Jedes Kölbchen enthält im Hauptstück 5,25 ccm Flüssigkeit, im Ansatzstück 0,25 ccm 7% KOH.

	O_2-Verbrauch in cmm nach 60 Min.			
	5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN	5,25 ccm Phosphatpuffer-Leberextrakt + m/200 NaCN + 2,5 mg Adrenalin	O_2-Verbrauchsdifferenz von Spalte 3—2	
ohne	85	195	110	
Harnstoff 20%	33*	43	10	91% Hemmung
„ 10%	54*	137	83	25% „
„ 2,5%	70*	187	117	6% Aktivierung
„ 0,8%	87	220	133	21% „
„ 0,2%	85	228	143	30% „

* Der niedrige O_2-Verbrauch ist bedingt durch die hemmende Wirkung hoher Harnstoffkonzentrationen auf die Atmung.

Es sei am Ende der Arbeit noch ein negatives Versuchsergebnis mitgeteilt. Wir haben unter anderem die Aminooxydaseaktivität auch in Gegenwart verschieden hoher Ergotaminkonzentrationen untersucht. Der größere Teil der Versuche ergab, daß Ergotamin ohne Einfluß auf die Wirksamkeit des Fermentes ist. Wenn überhaupt, dann sahen wir stets eine geringe Aktivierung der Aminooxydase durch das Ergotamin in Konzentrationen von 1 : 100000 bis 1 : 10000000. Die Aufhebung der Adrenalinwirkung bzw. deren Umkehr in Gegenwart von Ergotamin kann demnach nicht oder nur mit allergrößter Einschränkung auf einen durch diese Base hervorgerufenen beschleunigten fermentativen Adrenalinabbau bezogen werden.

H. Gremels[32] zählt die Überträgerstoffe des vegetativen Nervensystems Azetylcholin und Adrenalin zu den sog. Potentialstoffen, die nach der Theorie von W. Straub[33] nicht so sehr durch ihre absolute Konzentration, sondern vielmehr durch den Ausgleich eines bestimmtwertigen Konzentrationspotentials in der Richtung zum Zellinnern hin wirken. Den Potentialstoffen stellt H. Gremels die Zustandsstoffe gegenüber, durch deren Anwesenheit die Wirkungsbedingungen für Potentialstoffe eine Änderung erfahren können. Zu den Zustandsstoffen müssen auf Grund unserer Untersuchungen auch das Veritol, Ephedrin und Pervitin, ebenso wie die Narkotika und der Harnstoff gerechnet werden, während Adrenalin, Adrianol und Sympatol zu den Potentialstoffen zu zählen sind. Eine Erhöhung des Konzentrationspotentials bedeutet nach dem oben Gesagten eine Wirkungszunahme, während eine Abnahme des Konzentrationsgefälles einer Wirkungsverminderung gleichkommt. Nun wird z. B. im Organismus das physiologische Adrenalinkonzentrationspotential im wesentlichen bestimmt von der Größe der Adrenalinbildung an den sympathischen Nervenendigungen und der Geschwindigkeit der Adrenalinzerstörung im Zellinnern. Wir[38] haben den Teilungskoeffizienten Öl/Wasser für das Hydrochlorid des Adrenalins, Sympatols, Veritols, Ephedrins und Pervitins bestimmt und dabei festgestellt, daß der des Adrenalin-Hydrochlorids am größten und der des Pervitin-Hydrochlorids am kleinsten ist, während der des Sympatols, Veritols und Ephedrins dazwischen liegt. Nach der Darstellung von Wilbrandt[14] hängt die Leichtigkeit und Geschwindigkeit, mit der Moleküle die Grenzflächen tierischer Zellen passieren können, von deren Molekularvolumen und ihrer Lipoidlöslichkeit ab. Nach dieser Formulierung müßte unter den von uns untersuchten Stoffen das Adrenalin das beste Eindringungsvermögen in die tierische Zelle besitzen. Zweifellos spricht die Tatsache, daß die wirksame Adrenalinmenge weit unter der anderer Sympathikomimetika liegt, der schnelle Wirkungseintritt und die kurze Wirkungsdauer dafür, daß Adrenalin auf Grund seines günstigen Teilungskoeffizienten leicht in die tierische Zelle einzudringen vermag und dort sehr rasch von der Aminooxydase zerstört werden kann,

wodurch es physiologisch unwirksam wird. Andererseits wird man annehmen dürfen, daß auf Grund des niedrigen Teilungskoeffizienten Öl/Wasser, den Veritol, Ephedrin und Pervitin besitzen, die Zellgrenzflächen für diese Stoffe ein relatives Passagehindernis bilden, so daß man vermuten darf, da Veritol, Ephedrin und Pervitin auf dem Blutwege dem Organ zugeführt werden, daß die Konzentration dieser Stoffe in der Umgebung der Zelle stets größer sein wird als im Zellinnern. Es kann im idealen Falle die Veritol-, Ephedrin- oder Pervitinkonzentration in der Umgebung der Zelle gerade so groß sein, daß die Aminooxydase gehemmt wird, während die intrazelluläre Konzentration an diesen Stoffen die Aminooxydase aktiviert. Eine verminderte Adrenalinzerstörung in der weiteren und engeren Umgebung der Zelle, und ein gleichzeitig beschleunigter Adrenalinabbau im Zellinnern schafft ein höheres Adrenalinkonzentrationsgefälle und damit eine Wirkungssteigerung. Hohe Veritol-, Ephedrin- und Pervitinkonzentrationen, die auch im Zellinnern die Aminooxydase hemmen, müssen nach der Potentialtheorie die Adrenalinwirkung herabsetzen oder aufheben. GRAHAM[34] hat in der Tat durch sehr eingehende Untersuchungen an verschiedenen isolierten Organen und am Gesamttier für das Ephedrin nachweisen können, daß es in niedrigen Konzentrationen die Adrenalinwirkung steigert, während sie durch Ephedrinkonzentrationen von 10^{-6} aufwärts abgeschwächt und durch Konzentrationen *über* 10^{-3} aufgehoben wird.

Die Tatsache, daß die Aminooxydase durch Substanzen gehemmt wird, die mit den spezifischen Gruppen des Fermentes in Beziehung treten, aber im Gegensatz zu den leicht oxydierbaren Substratmolekülen eine feste dauerhafte Verbindung mit den spezifischen Enzymgruppen eingehen, legt die Vermutung nahe, daß auch der Hemmung der Cholinesterase durch Physostigmin und Prostigmin der gleiche Wirkungsmodus zugrunde liegt. Wenn man die Strukturformeln von Azetylcholin, Physostigmin und Prostigmin miteinander vergleicht (S. 522), so sieht man, daß es sich bei allen drei Körpern um Ester handelt. Azetylcholin ist ein Ester, der sehr leicht in Cholin und Essigsäure aufgespalten wird, während, wie man aus der langen Wirkungsdauer des Physostigmin und Prostigmin entnehmen kann, diese beiden einer fermentativen hydrolytischen Aufspaltung sehr lange Widerstand leisten. Das Physostigmin ist ein Methylkarbaminsäureester des Eserolins und das Prostigmin ein Diamethylkarbaminsäureester des Oxyphenyltrimethylammoniummethylsulfates. Während also im Azetylcholin der Ester der Essigsäure mit einem primären Alkohol fermentativ sehr leicht verseift werden kann, scheinen die Ester der Karbaminsäure mit phenolischen OH-Gruppen von sehr stabiler Natur zu sein. Aus diesen Gründen ist das Azetylcholin sowohl hinsichtlich seiner Wirkungsweise als auch seiner Zerstörbarkeit dem Adrenalin an die Seite zu stellen und die Wirkung des Physostigmins und Prostigmins der des Ephedrins und Pervitins vergleichbar. Wir werden demnach auch die Parasympathikus-

reizstoffe einzuteilen haben in echte Vagusreizstoffe vom Typ des Azetylcholins und in sog. Zustandsstoffe, Substanzen also, die nicht selbst als Vagusreize wirksam sind, sondern nur die Wirkung des Azetylcholins verändern. Zu ihnen gehört das Physostigmin und Prostigmin.

Die Tatsache, daß die Amine, bei denen die Methylamingruppe nicht am endständigen Kohlenstoffatom der Seitenkette substituiert ist, selbst nicht fermentativ zerstört werden, aber die Aminooxydase hemmen bzw. in kleinsten Dosen aktivieren, könnte in pharmako-therapeutischer Hinsicht von Bedeutung sein. Es ist anzunehmen, daß die Sympathikusreizwirkung sowohl des Adrenalins als auch des Sympatols oder Adrianols nach Vorbehandlung oder durch Zusatz entsprechender Mengen Veritol, Ephedrin, Ephetonin oder Pervitin gesteigert, vor allem erheblich verlängert sein wird. Wir[38] haben bereits entsprechende klinische Untersuchungen mit Veritol, Ephetonin und Pervitin durchgeführt, die diese Annahme bestätigt haben.

Zusammenfassung.

Es wurde die Geschwindigkeit der fermentativen Desaminierung und Oxydation des Adrenalins, Adrianols, Sympatols, Veritols, Ephedrins und Pervitins durch Messung der zur Oxydation benötigten Sauerstoffmenge quantitativ verfolgt. Adrenalin, Adrianol und Sympatol werden durch die Aminooxydase rasch, Veritol, Ephedrin und Pervitin überhaupt nicht abgebaut. Letztgenannte Substanzen hemmen in höheren und mittleren Konzentrationen den fermentativen Abbau des Adrenalins, Adrianols und Sympatols, in niedrigsten Konzentrationen wirken sie auf die Aminooxydase in aktivierendem Sinne.

Die Geschwindigkeit des fermentativen Adrenalinabbaues geht im Bereich kleinerer Adrenalinkonzentrationen diesen proportional, in Gegenwart größerer Substratmengen nimmt sie im Verhältnis zur zugesetzten Adrenalinmenge ab.

Die Hemmungswirkung von Veritol, Ephedrin und Pervitin auf die Aminooxydase ist in Gegenwart kleinerer Substratmengen *prozentual* stärker als in Gegenwart größerer. Diese Tatsache spricht auch für eine Blockierung der spezifischen Enzymgruppen durch die genannten Körper.

Für die Frage, in welcher Konzentration Veritol, Ephedrin und Pervitin noch fermenthemmend oder bereits fermentaktivierend wirken, ist nicht allein die absolute Konzentration dieser Stoffe ausschlaggebend, sondern auch das Verhältnis der Konzentration des Hemmungskörpers zu der des Substrates.

Die phenolischen OH-Gruppen am Ring des Adrenalinmoleküls sind ohne Bedeutung für die oxydative Desaminierung der Seitenkette.

Milchsäure bewirkt eine der durch sie hervorgerufenen p_H-Verschiebung entsprechende Hemmung der Aminooxydase. Es wird die physiologische und pathologische Bedeutung dieses Befundes erörtert.

Ultraviolettbestrahlung eines aminooxydasehaltigen Leberextraktes bewirkt eine starke, vorübergehende Aktivierung des Enzyms.

Reduzierende Substanzen hemmen, oxydierende beschleunigen die Fermentwirksamkeit.

Bestimmte Narkotika und der Harnstoff üben über eine entsprechende Änderung des physikalisch-chemischen Zustandes des kolloidalen Anteils des Ferments in niedrigen Konzentrationen einen aktivierenden, in höheren einen hemmenden Einfluß auf die Aminooxydase aus.

Es wird eine Unterteilung der auf das vegetative Nervensystem wirkenden Stoffe vorgenommen, und zwar nach dem Vorschlag von H. Gremels in Potentialstoffe und Zustandsstoffe.

Es wird auf die eventuelle pharmako-therapeutische Bedeutung eines Teiles der Befunde hingewiesen.

Literatur.

[1] Stöhr, Ph.: Klin. Wschr. **1939**, 41. — [2] Adrian, E. D.: J. Physiol. (Brit.) **74**, 115 (1932). — The Mechanism of Nerv. Action. London 1935. — [3] Erlanger and Gasser: Elektr. Signs of Nerv. Activity. Philadelphia 1937. — [4] Heim, F.: Arch. exper. Path. (D.) **196**, 51 (1940). — [5] Loewi u. Navratil: Pflügers Arch. **214**, 678 (1926). — [6] Genuit u. Labenz: Arch. exper. Path. (D.) **198**, 369 (1941). — [7] Heim, F.: Arch. exper. Path. (D.) **195**, 59 (1940); **202**, 215 (1943). — [8] Ammon: Erg. Enzymforsch. **9** (1943). — [9] Blaschko, H., D. Richter and H. Schlossmann: J. Physiol. (Brit.) **90**, 1 (1937); **91**, 13 (1938). — [10] Blaschko, H.: J. Physiol. (Brit.) **93**, 7 (1938). [11] Mann and Quastel: Nature (Brit.) **144**, 943 (1939). — [12] Beyer, K. I.: J. Pharmacol. (Am.) **71**, 151 (1941). — [13] Hauschild: Klin. Wschr. **1941**, 363. — [14] Wilbrandt, W.: Erg. Physiol. **40** (1938). — [15] Rein, R.: Verh. dtsch. Ges. Kreisl.forsch. **1937**. — Pflügers Arch. **241**, 402 (1938). — [16] Gremels, H.: Arch. exper. Path. (D.) **188**, 79 (1937); **194**, 629 (1940). — [17] Rous, P.: J. exper. Med. (Am.) **41**, 379, 451, 739. — [18] Fiske and Subbarow: J. biol. Chem. (Am.) **81**, 629 (1929). — [19] Sacks, J. und Mitarbeiter: Amer. J. Physiol. **118**, 697 (1937). — [20] Jokl: Pflügers Arch. **232**, 687 (1933). — Klin. Wschr. **1935 I**, 1, 139. — [21] Gremels, H.: Arch. exper. Path. (D.) **194**, 629 (1940). — [22] Wels: Arch. exper. Path. (D.) **181**, 147; **184**, 101; **188**, 265. [23] Kochmann: Biochem. Z. **136**, 49 (1923). — In Heffters Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Erg.-Bd. II. — [24] Heim, F. u. A. Fahr: Arch. exper. Path. (D.) **195**, 59 (1940). — [25] Heim, F. u. Rohde: Arch. exper. Path. (D.) **202**, 215 (1943). [26] Pauli, W.: In Pauli-Valko: Eiweißkörper. Dresden-Leipzig 1933. — [27] Beck u. Schormüller: Kolloid.-Z. **80**, 333 (1937). — [28] Heim, F.: Biochem. Z. **291**, 88 (1937). — [29] William u. Watson: Nature **139**, 506 (1937). — [30] Burck u. Greenberg: J. biol. Chem. (Am.) **87**, 197 (1933). — [31] Heim, F.: Biochem. Z. **291**, 88 (1937). — Arch. exper. Path. (D.) **191**, 212 (1938); **192**, 276 (1939). — [32] Gremels, H.: Erg. Physiol. **42** (1939). — [33] Straub, W.: Pflügers Arch. **119**, 127 (1907). [34] Graham, I. D. P. and M. R. Gurd: J. Pharmacol. (Am.) **72**, 48 (1941). — [35] Zit. nach Lehnartz: Erg. Physiol. **36**, 938. — [36] Zit. nach Rein: Physiologie des Menschen, S. 296, 297. Berlin 1941. — [37] Zit. nach Lehnartz: Chemische Physiologie, S. 348, 349, 428, 429. Berlin 1943. — [38] Noch unveröffentlicht.

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität Greifswald und dem Forschungsinstitut für Diabetes Garz/Rügen (Direktor: Prof. Dr. Katsch).

Zur Frage der Kohlehydratstoffwechselwirkung des Kallikreins (Padutins).

Von

Dr. G. Mohnike und Dr. Lübken, Assistenten der Klinik.

(Eingegangen am 12. November 1946.)

Die Kreislaufwirkung des von Frey entdeckten und hauptsächlich von ihm und seinen Mitarbeitern erforschten Hormons Kallikrein (Kk.) ist heute allgemein anerkannt; sie beruht auf „der Erweiterung der kleinsten Gefäße . . . von Blut, Muskulatur, Gehirn, Lunge, Herz[1]". Unsicherheit herrscht jedoch noch über die Frage einer möglichen günstigen Beeinflussung des Kohlehydrat- (Kh.) Stoffwechsels, einem Problem, dem neben der theoretischen, gerade heute in der Zeit der Insulinknappheit, eine große praktische Bedeutung zukommt.

Frey[1] haben zuerst auf eine blutzuckersenkende Wirkung des Kk. bei Diabetikern hingewiesen. Zunächst berichtete Frey[1] von 2 Fällen, wo gleichzeitig mit einer Kk.-Behandlung Senkung der Nüchternblutzucker eintrat. Nähere Angaben, vor allem über die Kh.-Bilanz, fehlen leider. Auch die zusammen mit Kraut und Werle publizierten Beobachtungen[2] sind nicht absolut beweiskräftig. Bei den 8 akuten Versuchen (Dosen von 5—30 E Kk. per os oder i.m.) fehlen leider Vergleichsprofile, so daß ein Spontanabsinken des Blutzuckers nicht ausgeschlossen wird. Bei Beurteilung der Dauermedikation (5 Fälle, bei denen 10 E Insulin (Ins.), 11,7 E Padutin (Pad.) gleichgesetzt wurden — 23,4—90 E Kk. per os oder i.m.) wird das Hauptgewicht auf die Nüchternblutzucker gelegt, die bekanntlich bei Diabetikern erheblichen Schwankungen unterworfen sind. Die ausgesprochenste Blutzuckersenkung (Frau Sch.) tritt gleichzeitig mit einer Kürzung der Kh.-Zufuhr von 40 auf 24 g ein! Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, daß Kk. den Blutzucker von Diabetikern vermindert, und zwar oft in überraschend starkem Ausmaß, bei längerer Darreichung aber nicht von gleichbleibender Wirkung ist. In Ergänzung dieser Versuche hat Herbig[3] die Blutzuckerwirkung des Kk. an pankreaslosen Hunden studiert. Auch hier fehlen leider die vergleichenden Leerversuche, sowie Angaben über die Harnzuckerausscheidung. Wichtig ist ferner, daß sich der Decursus bei keinem der Versuchstiere aufhalten ließ. Verfasser folgert, daß eine meßbare Beeinflussung im Sinne einer Blutzuckersenkung festzustellen sei (Kk.-Dosen bis 50 E). Weiter ist bemerkenswert, daß Frey[2] in keinem Fall einen hypoglykämisierenden Effekt des Kk. beim stoffwechselgesunden Menschen oder Versuchstier fanden, abgesehen von 4 gegenüber mehr als 30 Experimenten, die Frey, Werle und Sackers[4] in einer späteren Mitteilung leider ohne genaue Daten bekanntgaben.

---

[1] Frey: Dtsch. Z. Chir. **223**, 481 (1931). — [2] Frey, Kraut u. Werle: Klin. Wschr. **1932 I**, 846. — [3] Herbig: Arch. exper. Path. (D.) **167**, 555 (1932). — [4] Frey, Werle u. Sackers: Z. exper. Med. **96**, 404 (1935).

In der Literatur findet sich unseres Wissens nur noch bei Elmer und Scheps[5] eine kurze Notiz über einen Fall mit Kk.-Dauermedikation bei Diabetes mellitus, wobei jedoch kein Stoffwechseleffekt beobachtet wurde.

Während in Übereinstimmung mit den Freyschen Ergebnissen Sivó und v. Dobozy[6] beim Gesunden keine Blutzuckersenkung durch Kk. hervorrufen konnten (Dosierung 8 E), beschrieb Altenburger[7] als erster einen solchen Effekt, wenn auch geringen Ausmaßes (Dosierung ebenfalls 8 E), was auch Straube[8] in der Mehrzahl seiner Fälle bestätigt fand. (1—4 E Kk.-„Blutzuckersenkung meist gering und ohne klinische Bedeutung".)

Dieser Autor glaubte auch bei Zuckerkranken nach geringen Dosen (2 E) eine leichte hypolgykämisierende Kk.-Wirkung zu sehen, leider fehlen hier die das Ergebnis sichernden Leerversuche. Ähnlich fanden Fichera und Lanza[9,10] bei Gesunden eine geringere, bei Diabetikern eine stärkere Blutzuckersenkung nach 4—8 E Pad. Dagegen nahmen Elmer und Scheps[5] bei hohen peroralen Darreichungen (35—70 E) gar keinen oder nur einen unbedeutenden Effekt an.

Auch die Wirkung auf die alimentäre Hyperglykämie wird verschieden beurteilt. Fichera und Lanza[9,10] fanden eine Verminderung und ebenso (beim Stoffwechselgesunden) Altenburger[7], während Herbig[3] dies bei normalen Hunden nicht bestätigen konnte. Frey, Werle und Sackers[4] sahen nur *manchmal* einen Kk.-Einfluß auf alimentäre Hyperglykämie und hypoglykämische Nachschwankungen.

Herbig[3] konnte nur in einem von 3 Tierversuchen Ausbleiben der Adrenalinhyperglykämie bei gleichzeitiger Kk.-Gabe wahrnehmen, dagegen stellten Fichera und Lanza[9,10], sowie Sivó und v. Dobozy[6] übereinstimmend Dämpfung des Blutzuckeranstiegs bei entsprechenden Versuchsanordnungen fest (Sivó und v. Dobozy: Stoffwechselgesunde; 1 mg Adrenalin + 8 E Pad.; Verringerung des Blutzuckeranstiegs um 50—60% bei 4 angegebenen Versuchen).

Die Untersuchungsergebnisse über die Kk.-Wirkung auf den Kh.-Stoffwechsel sind also nicht übereinstimmend und auch bei günstigem Ausfall meist nicht als absolut beweisend anzusehen; die Kk.-Wirkung scheint keinesfalls erheblich zu sein.

Es muß mit Frey[11] betont werden, daß Verunreinigungen des Kk.-Präparates durch Ins. nicht anzunehmen sind und ebensowenig eine Identität mit diesem Hormon. Eine Beziehung zwischen beiden Wirkstoffen besteht hinsichtlich ihrer Herkunft aus dem Pankreas (Frey[1, 11]), wenn auch Werle und v. Roden[12] sowie Korányi[13] die Mundspeicheldrüsen als akzessorische Kk.-Bildungsstätten fanden; ferner ließ sich eine Steigerung der Kk.-Ausscheidung beim pankreaslosen Tier durch Insulingabe von Frey, Kraut und Schulz[11] auslösen. Es ist wichtig, sich eine Vorstellung über die Sekretionsproportion des Ins. zum Kk. zu machen. Das Langerhanssche Organ der menschlichen Bauchspeicheldrüse produziert im Laufe von 24 Stunden 70—100 E Ins. (Joslin[14, 15]), während nach Frey und Werle[16] 0,2 E Kk. je Kubikzentimeter Harn ausgeschieden werden, und die Sekretion mit dem Duodenalsaft nach Werle[17] mindestens 700 E je Tag betragen soll. Theoretisch ist hieraus schlecht zu begründen, daß 15 E Kk. im Stoffwechsel-

[5] Elmer u. Scheps: Klin. Wschr. **1932 II**, 1993. — [6] Sivó u. v. Dobozy: Klin. Wschr. **1934 II**, 1602. — [7] Altenburger: Klin. Wschr. **1933 I**, 789. — [8] Straube: Dtsch. Arch. klin. Med. **175**, 221 (1935). — [9] Fichera u. Lanza: Riforma med. **1934**, 243. Ref. nach Kongr.zbl. — [10] Fichera: Monit. Endocrin. (It.) **1**, 105 (1933). Ref. nach Kongr.zbl. — [11] Frey, Kraut u. Schulz: Arch. exper. Path. (D.) **158**, 334 (1930). — [12] Werle u. v. Roden: Biochem. Z. **301**, 328 (1939). — [13] Korányi, Szenies u. Hatz: Dtsch. med. Wschr. **1937 I**, 55. — [14] Joslin, Root, White u. Marble: The Treatment of Diabetes Mellitus. Philadelphia 1940. — [15] Goldner u. Clark: J. clin. Endocrin. **4**, 194 (1944). — [16] Frey u. Werle: Klin. Wschr. **1933 I**, 600. — [17] Werle: Biochem. Z. **269**, 415 (1934).

effekt 10 E Ins. entsprechen sollen, was Frey, Kraut und Schulz[11] aus den Tierversuchen von Herbig[3] schließen.

Auch über den Wirkungsmodus des Kk. wurde schon diskutiert. Frey[2, 11] erklären, daß es sich — wie schon erwähnt — nicht um den Effekt von Insulinbeimengungen handeln könne und ebenfalls nicht um eine Co-Zymasewirkung, wie Brugsch und Mitarb.[18] vermutet hatten. Herbig[3] schloß aus seinen Versuchen auf eine Aktivierung von latentem Ins. Sivó und v. Dobozy[6] glauben an einen Antagonismus zwischen Adrenalin und Kk. in bezug auf Kreislauf- und Kh.-Stoffwechsel. Fichera und Lanza[9, 10] schließlich vermuten einen der Insulinwirkung analogen Einfluß auf die Fähigkeit der Gewebe, Zucker festzuhalten und zu verbrennen. Unseres Erachtens ist zur Deutung neben der ersten Freyschen Beobachtung[1] über Blutzuckersenkung des Kk. bei einem Diabetiker mit Claudicatio intermittens vor allem der von Straube[8] geschilderte Fall bedeutungsvoll, wo sich bei einem an Angina pectoris leidenden Stoffwechselgesunden der stärkste überhaupt beschriebene hypoglykämisierende Kk.-Effekt einstellte (nach 2 E Blutzuckersenkung bis zum manifesten Schock bei 65 mg-%).

Zur Klärung der Kh-Stoffwechselwirkung des Kk. haben wir unter verschiedenen Anordnungen Versuche vorgenommen*.

Wir bevorzugten der besseren Steuerbarkeit wegen die intramuskuläre Injektion, wenn wohl auch der von Korányi und Szenies[19] vorgebrachte Einwand der peroralen Unwirksamkeit schon wegen der zahlreichen Untersuchungen Freys unberechtigt erscheint, der jedoch darauf hinweist[1], daß der Effekt nicht nur von der absoluten Menge, sondern auch von der Geschwindigkeit des Eindringens in die Blutbahn abhängt.

I. Akute Versuche.

Diese Versuche wurden von einem von uns (Mohnike) am Forschungsinstitut für Diabetes Garz/Rügen mit Unterstützung der Deutschen Zentralverwaltung für das Gesundheitswesen in der sowjetischen Besatzungszone durchgeführt. Über die bei diesen und ähnlichen Prüfungen notwendigen Versuchsbedingungen und auf die Fehlerquellen und Schwierigkeiten bei der Beurteilung nicht eindeutiger Ergebnisse haben wir erst kürzlich berichtet[20], worauf hier verwiesen wird.

Versuchsgruppe 1.

Wir haben zunächst unter Zugrundelegung der Proportion 1 E Ins. = 2 E Kk. vergleichende Belastungsversuche an 11 nüchternen Diabetikern durchgeführt (Zahlenwerte Tabelle 1). Es handelt sich um auf Ins. eingestellte, meist mittelschwere Zuckerkranke verschiedenen Alters und verschiedener Typen. Es wurden ab morgens 7 Uhr in $^1/_2$stündlichen Abständen im ganzen 11 Blutzuckerbestimmungen (nach Hagedorn und Jensen) durchgeführt, wobei Ins. bzw. Kk. unmittelbar nach der ersten Blutentnahme gespritzt wurden.

[18] Brugsch, Horsters u. Rothmann: Med. Klin. **27**, 1378 (1931). — * Benutzt wurde das Präparat Pad., das uns von der Fa. I.G. Farben-Industrie AG., Leverkusen, in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt wurde. — [19] Korányi u. Szenies: Klin. Wschr. **1939 I**, 544. — [20] Mohnike: Pharmazie **1946**, 107.

Tabelle 1.

Nr.	R.-Nr.		Blutzuckerwert in ½stündlichen Abständen										
1.	8367	8 E Ins.	177	199	164	164	144	125	125	116	96	110	91
		16 E Pad.	139	144	144	144	167	178	178	167	167	153	155
2.	8383	8 E Ins.	199	209	177	116	83	71	71	61	57	66	184
		16 E Pad.	397	301	392	272	402	431	413	395	297	286	284
3.	8362	8 E Ins.	188	197	192	146	130	101	98	77	66	78	86
		16 E Pad.	219	185	176	182	171	175	158	166	153	148	126
4.	8385	8 E Ins.	221	270	233	206	189	162	146	101	121	—	—
		16 E Pad.	169	187	236	246	246	252	274	223	254	270	256
5.	8368	8 E Ins.	297	272	256	231	214	184	180	142	137	—	—
		16 E Pad.	297	307	326	422	400	395	268	408	393	390	390
6.	8382	8 E Ins.	221	229	225	185	185	148	114	114	100	108	103
		16 E Pad.	278	270	276	248	217	238	227	210	246	236	228
7.	8399	8 E Ins.	152	148	125	125	127	102	85	83	74	85	81
		16 E Pad.	101	117	105	111	119	119	113	105	99	114	107
8.	8401	8 E Ins.	168	152	136	125	115	119	105	92	86	61	57
		16 E Pad.	168	193	219	179	173	190	208	202	170	191	171
9.	8392	8 E Ins.	145	143	123	121	138	90	105	92	86	72	61
		16 E Pad.	110	145	154	148	152	200	236	238	226	240	240
10.	7806	8 E Ins.	226	220	159	182	148	134	115	107	62	107	94
		16 E Pad.	301	280	284	252	280	264	270	246	260	260	260
11.	8376	8 E Ins.	280	242	208	197	157	90	66	70	55	64	72
		16 E Pad.	320	385	401	385	383	380	369	351	311	322	297

Besonders beispielhaft und wertvoll sind die Versuche 5 und 8, bei denen jedesmal der gleiche Ausgangsblutzucker vorlag. Aus diesen Versuchen geht einwandfrei hervor, daß die Proportion Ins.: Kk. = 1 : 2 sich nicht bestätigt. Darüber hinaus berechtigen die Ergebnisse in keinem Fall zu dem Schluß, eine insulingleiche oder insulinähnliche Wirkung des Kk. anzunehmen, denn der Blutzucker stieg nach Kk. in 8 Fällen zum Teil erheblich an, während das geringe bis mäßige Absinken in 3 Fällen (Versuch 3, 6 und 10) sich zwanglos als spontane Glykoregulation erklärt.

Versuchsgruppe 2.

In 10 weiteren Fällen haben wir bei sonst gleicher Versuchsanordnung die Proportion Ins., Kk. im Verhältnis 1 : 3 angesetzt. Wir haben außerdem Leerprofile angefügt, um eine mögliche geringgradige Kk.-Wirkung zu erfassen (Zahlenwerte Tabelle 2).

Ein Vergleich der Blutzuckerwerte nach Ins. und Kk. (die Ausgangswerte liegen vor allem in den Versuchen 1, 2 und 6 nahe zusammen) erlaubt auch hier in keinem Fall die Annahme, daß 3 E Kk. einer E Ins. im Stoffwechseleffekt entsprechen. Unter Kk. kam es im Versuch 4 zu einem mäßigen, fast kontinuierlichen Absinken des Blutzuckers, in Versuch 8 liegen wenigstens die letzten Werte des Kk.-Profils recht niedrig. — Zum Vergleich zwischen Leer- und Kk.-Versuch sind zwei Beobachtungen (Fall 3 und 5) wegen stark differierendem Ausgangsblutzucker nicht zu verwerten. Bei Gegenüberstellung der restlichen 8 Versuche (die Ausgangsblutzucker liegen vor allem bei Fall 1, 2, 9 und 10 nahe zusammen) ergibt

Tabelle 2.

Nr.	R.-Nr.		Blutzuckerwerte in ½stündlichen Abständen										
1.	7834	8 E Ins.	260	246	184	116	107	95	82	75	66	64	57
		24 E Pad.	238	249	270	279	284	336	298	255	251	228	186
		Leerversuch	258	274	303	274	—	231	266	276	212	268	236
2.	8391	8 E Ins.	214	211	203	171	162	133	129	133	107	82	85
		24 E Pad.	210	190	195	222	193	195	184	194	195	186	162
		Leerversuch	183	196	200	230	221	198	209	211	—	259	310
3.	8388	8 E Ins.	131	115	87	83	78	83	82	73	67	65	60
		24 E Pad.	105	118	145	136	131	134	131	131	134	81	75
		Leerversuch	256	311	213	248	254	215	232	242	252	269	269
4.	8404	8 E Ins.	197	209	199	171	169	174	174	180	153	171	180
		24 E Pad.	237	216	208	208	210	218	208	170	175	168	159
		Leerversuch	188	204	190	213	177	143	139	152	157	160	171
5.	8407	8 E Ins.	269	218	193	182	190	180	159	158	163	121	112
		24 E Pad.	150	123	218	168	214	210	188	221	212	236	185
		Leerversuch	96	124	87	131	126	136	131	119	133	149	146
6.	8400	8 E Ins.	474	472	283	232	199	188	178	186	122	112	119
		24 E Pad.	484	471	462	448	406	440	467	460	439	604	487
		Leerversuch	411	390	427	433	407	427	—	407	413	427	429
7.	8419	8 E Ins.	195	224	203	174	182	120	140	129	114	59	72
		24 E Pad.	240	240	284	264	274	252	242	228	—	279	267
		Leerversuch	180	209	207	224	217	—	—	221	205	200	154
8.	7757	6 E Ins.	117	115	76	58	69	55	65	60	82	55	64
		18 E Pad.	163	169	142	185	154	160	158	131	113	96	93
		Leerversuch	114	144	133	144	128	142	135	140	110	113	136
9.	7796	6 E Ins.	89	101	65	46	55	40	51	49	47	55	59
		18 E Pad.	160	113	113	149	162	192	203	198	178	176	182
		Leerversuch	178	245	245	273	232	230	283	240	253	277	299
10.	8421	8 E Ins.	297	277	226	169	121	73	40	33	60	49	44
		24 E Pad.	84	71	64	96	66	50	71	55	53	60	63*
		Leerversuch	74	67	74	92	82	89	91	83	69	58	85*

sich in 4 Fällen (2, 8, 9 und 10) ein günstigerer Blutzuckerverlauf nach Kk. als im Leerversuch. Bemerkenswert ist, daß der Blutzuckersenkung nach Kk. bei Versuchsperson 4 (s. oben) eine etwa ebenso starke spontane entspricht! Die Differenzen zwischen Kk.- und Leerversuch sind gering, viel geringer als zwischen den Kk.- und Insulinbelastungen; irgendwelche Einheitlichkeit des Kurvenverlaufs mit etwaigem Wirkungsoptimum oder kontinuierlichem Absinken des Blutzuckers fand sich nicht.

Versuchsgruppe 3.

An 17 weiteren Diabetikern haben wir bei sonst gleichen Versuchsbedingungen (bei Versuchsperson 10 handelt es sich um einen renalen Diabetes) untersucht, ob Kk. die Insulinwirkung unterstützt. Wir führten daher Insulinbelastungen durch, die wir bei gleichbleibender Dosierung mit zusätzlicher Gabe von 16—40 E Kk. wiederholten (Zahlenwerte Tabelle 3).

Es zeigt sich, daß in der Mehrzahl der Fälle der Blutzuckerverlauf bei zusätzlicher Kk.-Gabe günstiger liegt (s. Versuche 8, 16 und 17, wo

* Die niedrigen Nüchternblutzucker erklären sich durch die Auswirkung einer PZ-Insulinspritze vom Morgen des Vortages.

Tabelle 3.

Nr.	R.-Nr.		Blutzuckerwerte in ½stündlichen Abständen									
1.	7796	4 E Ins.	293	326	301	261	226	219	224	174	162	188	193
		4 E Ins. + 16 E Pad.	397	422	385	385	303	289	277	267	247	228	204
2.	8396	4 E Ins.	230	224	219	156	126	89	69	64	57	52	95
		4 E Ins. + 16 E Pad.	314	291	209	167	119	102	80	87	87	69	68
3.	8432	4 E Ins.	96	114	124	105	91	67	67	87	44	50	86
		4 E Ins. + 16 E Pad.	385	385	318	316	277	273	269	267	234	206	204
4.	8445	4 E Ins.	140	153	207	178	140	158	162	167	167	136	144
		4 E Ins. + 16 E Pad.	110	105	96	71	98	105	85	94	105	96	100
5.	8456	4 E Ins.	138	143	140	126	126	122	117	136	110	134	109
		4 E Ins. + 16 E Pad.	168	179	181	176	152	143	131	136	127	124	87
6.	7834	4 E Ins.	168	199	203	147	147	122	122	129	114	127	131
		4 E Ins. + 16 E Pad.	219	246	248	240	219	194	219	195	188	150	124
7.	8458	4 E Ins.	201	174	186	201	156	145	145	174	185	165	152
		4 E Ins. + 16 E Pad.	147	181	194	161	156	138	161	172	152	154	147
8.	7757	4 E Ins.	97	99	56	51	69	54	45	56	52	60	54
		4 E Ins. + 16 E Pad.	109	112	64	47	51	51	51	38	40	40	54
9.	8438	8 E Ins.	143	140	112	92	92	79	67	56	51	54	60
		8 E Ins. + 16 E Pad.	196	176	183	169	145	145	94	82	92	81	69
10.	8446	4 E Ins.	56	65	58	51	51	51	52	65	54	56	60
		4 E Ins. + 16 E Pad.	54	45	69	81	56	60	52	58	51	63	58
11.	8434	4 E Ins.	201	212	179	167	99	108	119	89	69	78	72
		4 E Ins. + 16 E Pad.	159	127	167	170	127	112	120	96	117	103	110
12.	8527	8 E Ins.	149	161	165	154	149	112	110	100	105	104	92
		8 E Ins. + 20 E Pad.	213	238	247	196	183	153	142	162	135	97	85
13.	8552	8 E Ins.	235	302	201	172	158	127	117	126	99	82	73
		8 E Ins. + 20 E Pad.	183	213	185	178	153	158	149	138	124	99	83
14.	8549	8 E Ins.	289	267	198	126	149	157	151	114	102	55	59
		8 E Ins. + 20 E Pad.	172	192	172	131	126	120	76	82	74	70	45
15.	8553	8 E Ins.	212	208	193	152	125	118	120	118	112	129	118
		8 E Ins. + 40 E Pad.	289	277	247	155	140	119	109	105	73	60	73
16.	8529	8 E Ins.	214	179	195	147	150	150	136	122	113	106	94
		8 E Ins. + 40 E Pad.	191	200	164	121	93	78	77	80	60	50	46
17.	8548	8 E Ins.	168	174	166	136	103	—	68	67	38	63	87
		8 E Ins. + 40 E Pad.	191	164	149	68	48	28	68	55	41	32	32

annähernd gleiche Ausgangsblutzucker vorlagen). Es handelt sich jedoch auch hier um keinen sehr erheblichen Unterschied im Kurvenverlauf, wie wir ihn sonst bei Veränderungen der Insulindosis fanden Ferner ist bemerkenswert, daß eine stärkere Beeinflussung des Blutzuckers proportional steigender Kk.-Gabe nicht mit Sicherheit eintrat. Auch auf ein zeitliches Wirkungsoptimum des Kk. läßt sich aus dem Kurvenverlauf nicht schließen. Unter bestimmten Voraussetzungen kommt es im Anschluß an die Insulingabe zunächst zu einem Blutzuckeranstieg, der als reaktiv gedeutet werden muß. Auch diese reaktive Insulinhyperglykämie wird — abgesehen von Versuch 4 — nicht beeinflußt.

Versuchsgruppe 4.

Bei 13 Zuckerkranken haben wir die Beeinflussung der Adrenalinhyperglykämie durch Kk. beobachtet. Wir gaben jeweils 0,5 mg Suprarenin

Tabelle 4.

Nr.	R.-Nr.		Blutzuckerwerte in ½stündlichen Abständen										
1.	8533	0,5 mg S.	86	131	136	127	143	134	229	233	234	181	163
		0,5 mg S. + 20 E Pad.	91	85	112	167	133	163	154	169	151	162	138
2.	8542	0,5 mg S.	108	170	145	186	177	166	307	271	269	214	209
		0,5 mg S. + 20 E Pad.	105	124	190	194	203	221	236	211	228	222	232
3.	8560	0,5 mg S.	120	178	151	181	152	149	169	201	256	100	140
		0,5 mg S. + 20 E Pad.	76	120	140	190	251	196	200	154	169	161	138
4.	8545	0,5 mg S.	108	143	124	126	110	124	115	127	96	80	91
		0,5 mg S. + 20 E Pad.	120	117	154	192	162	171	135	126	127	110	94
5.	8540	0,5 mg S.	178	176	203	176	143	172	165	152	133	138	131
		0,5 mg S. + 40 E Pad.	203	203	203	217	222	194	205	209	205	147	152
6.	8543	0,5 mg S.	56	69	92	142	103	124	96	117	89	101	103
		0,5 mg S. + 40 E Pad.	47	74	92	107	95	88	70	74	58	65	59
7.	8547	0,5 mg S.	138	138	230	145	269	209	230	219	245	234	213
		0,5 mg S. + 40 E Pad.	225	252	285	285	281	269	334	281	227	302	284
8.	8537	0,5 mg S.	82	113	135	145	169	135	126	145	106	68	88
		0,5 mg S. + 40 E Pad.	134	172	159	134	192	163	138	131	120	154	124
9.	8555	0,5 mg S.	147	154	165	156	176	176	172	178	169	132	132
		0,5 mg S. + 40 E Pad.	218	237	252	224	176	194	159	170	176	173	202
10.	8531	0,5 mg S.	161	193	196	265	261	195	115	202	174	225	227
		0,5 mg S. + 40 E Pad.	264	274	304	290	276	268	262	216	243	245	295
11.	8528	0,5 mg S.	104	143	199	181	233	202	186	210	152	197	202
		0,5 mg S. + 40 E Pad.	168	234	212	212	234	267	208	244	240	258	243
12.	8530	0,5 mg S.	104	125	212	184	168	143	147	134	110	163	138
		0,5 mg S. + 40 E Pad.	214	216	250	245	243	170	163	185	145	174	191
13.	8556	0,5 mg S.	267	297	331	246	301	329	408	316	275	344	344
		0,5 mg S. + 40 E Pad.	321	330	259	291	328	335	308	316	—	196	245

und wiederholten den Versuch mit gleichzeitiger Injektion von 20—40 E Pad. i.m. Wir führten wieder 11 Blutzuckerbestimmungen in ½stündlichen Abständen durch, das Kk. gaben wir vor, das Suprarenin (S.) nach der ersten Blutentnahme (Zahlenwerte Tabelle 4).

In 4 Fällen (Versuch 1, 2, 6 und 13) verlief die Adrenalinhyperglykämie nach Kk. niedriger als im Kontrollversuch. Sie wurde jedoch nie unterbunden. In den Versuchen 3, 4 und 5 war die hyperglykämische Phase bei Kombination mit Kk. einwandfrei ausgeprägter. Bei den übrigen Beobachtungen kann infolge stärker differierender Ausgangswerte nur soviel gesagt werden, daß Kk. die Adrenalinhyperglykämie nicht unterbindet und eine Verringerung zweifelhaft ist. Ein Wirkungsunterschied zwischen 20 und 40 E konnte nicht festgestellt werden, ebensowenig ergab sich ein Anhalt für ein besonderes zeitliches Wirkungsoptimum.

II. Gesamtstoffwechselverhalten.

Von einem von uns (Lübken) wurde bei zuckerkranken Patienten der Medizinischen Universitätsklinik Greifswald der Einfluß von Padutininjektionen auf das Gesamtstoffwechselverhalten untersucht, und zwar in der Art, daß Insulin* durch Pad. etwa im Verhältnis 1 : 1 substi-

* Verwandt wurde in jedem Fall Altinsulin.

tuiert wurde. Es handelt sich in jedem Fall um mittelschwere, insulinbedürftige Diabetiker, deren Stoffwechsel nicht nur von der jetzigen, sondern auch von früheren Kliniksaufenthalten her gut bekannt war, so daß die Beurteilung hierdurch erleichtert wurde. Mit erheblichen Spontanschwankungen war in keinem Fall zu rechnen. Auf die Darstellung der näheren klinischen Einzelheiten wird aus Raumersparnisgründen verzichtet. Es wurde in jedem Fall eine genaue Stoffwechselbilanz geführt, der Blutzuckerverlauf wurde immer profilmäßig in 4 der Fälle verfolgt.

Vp. 1. Hauptb.-Nr. 1719/46. Kost 13 Broteinheiten (BE) mit 16+10+12 E Altinsulin. Tagesharnzuckerausscheidungen an den Tagen 1—5: 58,0; 19,2; 40,8; 23,2; 21,8 g, Azeton immer neg. An den Tagen 6 und 7 bei gleichbleibender Diät Ins. ersetzt durch 16+10+12 E Kk. Harnzuckerausscheidung am Tag 6 97,5 g; am Tag 7 192,6 g. Aceton pos., Präkoma, sehr schlechtes Befinden. Daher an den Tagen 8—12 wiederum Ins., 16+10+16 E, bzw. an den letzten 3 Tagen 16 +8 +20 E. Tagesharnzuckerausscheidungen 71,9; 82,3; 38,4; 57,9 und 12,9 g. Azeton wurde nur noch am Tag 8 in der morgendlichen Urinportion nachgewiesen. Das Befinden besserte sich entsprechend dem Stoffwechselverhalten rasch.

Vp. 2. Hauptb.-Nr. 2027/46. Bedingte Vollkost von etwa 25 BE. An den Tagen 1—5 20+8 +12 E Altinsulin, Tagesharnzuckerausscheidungen hierbei 20,7; 33,1; 32,1; 34,6; 7,4 g. Am Tag 8 Ins. durch 20+8 +14 E Kk. ersetzt, Harnzuckerausscheidung hierbei 105,6 g, Azeton pos., präkomatös. Deswegen am Tag 8 wiederum 20+8+14 E Ins., Glykosurie 7,7 g, Azeton nur noch in der Vormittagsmenge.

Vp. 3. Hauptb.-Nr. 1744/46. Bedingte Vollkost von etwa 25 BE. An den Tagen 1 und 2 bei 4+4+6 E Altinsulin 36,7 und 23,3 g Zucker ausgeschieden. An den Tagen 3, 4 und 5 Ins. auf 6 +6+6 E erhöht, hierbei Tagesglykosurie 18,2; 18,9 und 21,7 g. Ins. durch Kk. ersetzt. An den Tagen 6 und 7 je 6+6+6 E Kk., Harnzuckerausscheidungen 53,4 und 31,1 g. Kk. auf 12+6+12 E erhöht. Glykosurie hierbei an den Tagen 8 und 9 76,2 und 83,6 g. Kk. weiter auf 16+10+16 E heraufgesetzt, wobei an den Tagen 10 und 11 79,6 und 85,8 g Zucker mit dem Urin ausgeschieden wurden. Wegen schlechten Allgemeinbefindens Umstellung auf Ins. An den Versuchstagen 12 und 13 bei 10+6+10 E Ins. Glykosurien 21,1 und 20,1 g. Befinden wieder gut. Während der 6 folgenden Versuchstage (Tag 14—19) kein Kk. und kein Ins. Tagesharnzuckerausscheidungen hierbei 42,0; 56,1; 16,3; 62,8; 20,4 und 14,8 g. Befinden besser als während der ersten Kk.-Periode. Vom 20. bis zum 26. Tag wiederum Kk. An den Tagen 20—22 wurden 10+6+10 E, dann 6+4+6 E Kk. gespritzt. Der Tagesurinzucker belief sich an diesen Versuchstagen auf 18,8; 8,3; 17,8; 43,7; 78,8; 87,4; 114,8 g. Befinden verschlechterte sich laufend, daher wiederum Ins. statt Kk. Am Tag 27 bei 6+4+6 E Ins. Glykosurie 98,8 g, am Tag 28 Zuckerausscheidung bei 6+4+10 E Ins. 87,0 g, am Tag 29 bei 10+4+10 E Ins. 47,1 g Zucker im Urin. An den folgenden Tagen konnte der Harnzucker nicht mehr polarimetrisch bestimmt werden, da der Urin durch Prontosil sehr stark gefärbt war. Das Befinden besserte sich jedoch laufend und die Nüchternblutzucker lagen zwischen 100 und 200 mg-%.

Vp. 4. Hauptb.-Nr. 1849/46. Bedingte Vollkost von etwa 18 BE. Bei der Aufnahme gut ausgeglichen, daher sofort Kk. An den Tagen 1—5 4 E, Tagesharnzuckerausscheidungen 12,0; 15,8; 6,0; 0,0; 10,8 g. Dann Kk. auf 4+4+4 E erhöht, Glykosurie hierbei an den Versuchstagen 6—13: 22,5; 14,8; 8,5; 18,4; 27,0; 25,4; 20,6; 40,6 g. Wegen dieser Zunahme der Harnzuckerausscheidung Umstellung auf 4+4+4 E Altinsulin, womit die Glykosurie an den Tagen 14, 15 und 16 auf 18,7; 4,5 und 6,2 g zurückging.

Vp. 5. Hauptb.-Nr. 1397/46. Diabetesdiät von 14 BE, dazu 20 + 12 + 12 E Altinsulin. Tagesharnzuckerausscheidung hierbei an den Versuchstagen 1—5: 36,4; 19,0; 20,5; 6,2 und 57,7 g. Am 6. Tag statt des Ins. 20 + 12 + 12 E Kk. Tagesharnzuckerausscheidung stieg auf 220,3 g! Am 7. Versuchstag morgens 20 und mittags 12 E Kk. Glykosurie 134,3 g, noch kein Azeton im Urin nachweisbar, jedoch Azetongeruch der Atemluft, präkomatös, Blutzucker um 18 Uhr 593 mg-%. Daher sofort 20 E Ins. und um 23 Uhr nochmals 20 E Ins. Am 8. Versuchstag nur 8 BE Kohlehydrate mit 20 + 10 + 10 + 10 E Ins. Blutzucker sank auf 78 mg-% morgens, Azeton war noch in der ersten Portion nachweisbar, Tagesharnzuckerausscheidung 0,5 g. Am Tag 9 bei 22 BE und 10 + 10 + 10 E Altinsulin 22,2 g Zucker im Harn, am Tag 10 19 BE bei 10 + 10 + 20 E Altinsulin schwerer Schock, dadurch Harnzuckerausscheidung 100,1 g. Am Tag 11 18 BE mit 20 + 10 + 20 E Altinsulin, Tagesglykosurie 10,1 g, nochmals Schock. Am 12. Tag bei gleicher Kost 20 + 10 + 20 E Ins., wobei 40 g Zucker ausgeschieden wurden.

Diese fünf exakt klinisch beobachteten Fälle beweisen, daß Ersatz von Ins. durch Kk. in der angewandten Dosierung unmöglich ist und für die Patienten erhebliche Gefahren mit sich bringt, kam es doch bei 3 Versuchspersonen schon nach sehr kurzer Zeit der Kk.-Medikation zu einem Prä-

Tabelle 5.

Vp. 2. Hauptb.-Nr. 2027/46.

	5. Tag 20 + 8 + 12 E Ins.	6. Tag 20 + 8 + 14 E Kk.	7. Tag 20 + 8 + 14 E Ins.
7 Uhr	304 mg-%	341 mg-%	500 mg-%
12 Uhr	110 mg-%	348 mg-%	253 mg-%
18 Uhr	57 mg-%	495 mg-%	172 mg-%

Vp. 3. Hauptb.-Nr. 1744/46.

	3. Tag 6 + 6 + 6 E Ins.	8. Tag 12 + 6 + 12 E Kk.	10. Tag 16 + 10 + 16 E Kk.	12. Tag 10 + 6 + 10 E Ins.
7 Uhr	162 mg-%	175 mg-%	182 mg-%	159 mg-%
12 Uhr	149 mg-%	261 mg-%	227 mg-%	141 mg-%
18 Uhr	160 mg-%	224 mg-%	318 mg-%	154 mg-%

	17. Tag	19. Tag	24. Tag 6 + 4 + 6 E Kk.	32. Tag 16 + 10 + 14 E Ins.
7 Uhr	172 mg-%	134 mg-%	199 mg-%	163 mg-%
12 Uhr	208 mg-%	152 mg-%	299 mg-%	155 mg-%
18 Uhr	213 mg-%	121 mg-%	206 mg-%	78 mg-%

Vp. 4. Hauptb.-Nr. 1849/46.

	1. Tag 4 E Kk.	5. Tag 4 E Kk.	12. Tag 4 + 4 + 4 E Kk.	16. Tag 4 + 4 + 4 E Ins.
7 Uhr	161 mg-%	147 mg-%	117 mg-%	112 mg-%
12 Uhr	203 mg-%	214 mg-%	228 mg-%	171 mg-%
18 Uhr	163 mg-%	265 mg-%	153 mg-%	97 mg-%

Vp. 5. Hauptb.-Nr. 1397/46.

	3. Tag 20 + 12 + 12 E Ins.	6. Tag 20 + 12 + 12 E Kk.
7 Uhr	225 mg-%	306 mg-%
12 Uhr	214 mg-%	555 mg-%
18 Uhr	89 mg-%	489 mg-%

Tabelle 6.

Tag	Vp. 1 Reg.-Nr. 8482	Vp. 2 Reg.-Nr. 7369	Vp. 3 Reg.-Nr. 8489	Vp. 4 Reg.-Nr. 8055
	Insulinäquivalente			
1	7,2	9,4	7,1	36,2
2	7,1	8,3	6,0	35,7
3	6,6	8,4	7,6	36,8
4	7,4	8,4	7,9	28,7
5	7,3	8,5	7,7	31,4
6	7,0	6,9	6,9	34,4
7	7,7	8,4	7,7	35,4
8	7,9	9,3	7,3	28,6
9	6,8	6,8	8,3	29,0
10	7,2	8,4	8,0	34,4
11	7,6	8,5	8,2	32,5
12	7,8	7,7	8,3	30,0
13	8,0	7,6	8,7	30,8
14	8,2	8,2	9,1	32,6
15	7,8	9,3	—	33,3
16	8,2	8,0	—	32,6
17	—	8,2	—	34,6
18	—	8,9	—	35,4
19	—	8,7	—	37,2
20	—	9,5	—	37,6
21	—	7,9	—	37,6
22	—	9,2	—	45,6
23	—	8,6	—	45,1
24	—	—	—	45,6
25	—	—	—	44,1

koma. Beleuchtet wird das Verhältnis Ins. zu Kk. noch durch den Blutzuckerverlauf, den wir in 4 Fällen an Tagesprofilen (Blutzuckerbestimmungen um 7, 12 und 18 Uhr) verfolgten (Zahlenwerte Tabelle 5).

Im Diabetikerheim Garz hat einer von uns (MOHNIKE) bei etwa 10 Zuckerkranken Kk. in geringen Dosen (4 E i.m. täglich oder jeden 2. Tag) in der letzten Zeit zur Bekämpfung von peripheren Durchblutungsstörungen angewandt. Abgesehen von einer günstigen Beeinflussung dieser Komplikation, wie sie ja bekannt ist, konnte bei so niedriger Dosierung kein Stoffwechseleffekt festgestellt werden. Wir verzichten daher auf die Veröffentlichung der Protokolle. — Außerdem wurde im Diabetikerheim Garz bei 4 Fällen Kk. per os in Dosen von 9—18 E je Tag als Zusatz zur Insulintherapie bei völlig gleichgehaltener Einstellung gegeben.

Vp. 1 (Reg.-Nr. 8482). Kost 27 BE, 24 + 24 E Altinsulin. An den Versuchstagen 7—10 zusätzlich 18 E Kk. per os.

Vp. 2 (Reg.-Nr. 7369). Kost 15 BE, 8 + 6 + 8 E Altinsulin. An den Versuchstagen 8—11 und 13—16 zusätzlich 18 E Kk. per os.

Vp. 3 (Reg.-Nr. 8489). Kost 23 BE, 20 + 20 E Altinsulin. An den Versuchstagen 3—10 zusätzlich 18 E Kk. per os.

Vp. 4 (Reg.-Nr. 8055). Kost 26 BE. An den Versuchstagen 1—21 10 E Depotinsulin, dann 8 E Depotinsulin. Vom Versuchstag 10 ab laufend zusätzlich 9 E Kk. per os.

Ein günstiger Stoffwechseleffekt muß sich an den Insulinäquivalenten (Grammzahl tolerierte KH/E Fremdinsulin) im Sinne einer Erhöhung auswirken. Wir geben die Insulinäquivalente in Tabelle 6 wieder, die Werte aus der Periode mit zusätzlicher Kk.-Behandlung sind fett gedruckt.

Die Insulinäquivalente liegen während der zusätzlichen Kk.-Medikation bei den Beobachtungen 1 und 2 nicht höher. Bei der Beobachtung 3 steigen sie langsam an, welche Stoffwechselbesserung aber über die Nachperiode hinaus andauerte und ab Tag 15 zu einer Erweiterung der Kost von 23 auf 25 BE und zu einer Insulinkürzung von 20 + 20 E auf 18 + 18 E zwang. Die Besserungsphase hält jetzt (4 Wochen nach dem Versuch) noch an, so daß ein Kk.-Einfluß ausgeschlossen werden kann. Bei Versuchsperson 4 dagegen möchten wir einen Stoffwechseleffekt des Kk. annehmen. Es handelt sich hier um einen schon seit Monaten stationär beobachteten, nicht sehr schweren Diabetes mit hochgradiger Sklerose (schon 2 Schlaganfälle) und peripheren Durchblutungsstörungen. Während der Beobachtungszeit ging die Harnzuckerausscheidung unter Kk. offenbar zurück, so daß das Ins. von 10 auf 8 E reduziert werden konnte.

Zusammenfassung.

Wir haben unter verschiedenen Versuchsbedingungen die Wirkung des Kallikrein (Kk.) auf den Kohlehydratstoffwechsel von Diabetikern untersucht, da ein Überblick über die betreffenden Literaturangaben Widersprechendes ergibt und die positiven Ergebnisse außerdem meist nicht als unbedingt stichhaltig anzusehen sind.

Ein Vergleich zwischen Ins. und Kk. (im Verhältnis 1 : 2 und 1 : 3) liefert im akuten Versuch bei Anwendung von Dosen bis zu 24 E Kk. i. m. keinen Anhalt für eine insulingleiche oder insulinähnliche Wirkung des „Kreislaufhormons".

Bei Gegenüberstellung des Blutzuckerverlaufs nach Kk. (bis 24 E i. m.) mit einem entsprechenden Leerversuch ergibt sich etwa bei der Hälfte der Fälle eine geringe Differenz zugunsten des mit Kk. kombinierten Experiments. Die Unterschiede der Kurven sind jedoch bei der angewandten Dosierung nicht derart, daß sie in Parallele zu einer Insulinwirkung gesetzt werden könnten.

Kombiniert man Ins. mit Kk. (bis 40 E Kk. i. m.), so verläuft der Blutzucker in der Mehrzahl der Fälle günstiger als nach Ins. allein; der Unterschied ist jedoch nicht erheblich.

Ein Kk.-Einfluß (Dosen bis 40 E i. m.) auf die Adrenalinhyperglykämie wurde nicht bewiesen. Wir fanden bei 13 Beobachtungen 4mal eine geringere Blutzuckersteigerung als im Kontrollversuch, in 6 Fällen war das Ergebnis zweifelhaft und bei 3 weiteren war die Hyperglykämie sogar stärker.

Bei allen akuten Versuchen ergab sich kein Anhalt für ein zeitliches Wirkungsoptimum des Kk. auf den Blutzucker. Auch war ein verschiedenes Verhalten des Blutzuckers proportional der Kk.-Dosierung nicht sinnfällig.

Diese Versuche zeigten keine besonders auffällige Kk.-Wirkung bei bestimmten Altersklassen und bestimmten hormonalen Situationen, weswegen wir oben auf diese Frage nicht besonders eingegangen sind. Ferner ist bemerkenswert, daß bei gleichzeitiger Kk.-Gabe die gegenregulatorisch bedingte initiale Insulinhyperglykämie — mit einer Ausnahme — nicht unterblieb.

In Bestätigung dieser Befunde zeigten die klinischen Stoffwechselbeobachtungen, daß eine Substituierung des Ins. durch Kk.-Injektionen — meist im Verhältnis 1 : 1 — unmöglich ist. Es kam rasch zur akuten Stoffwechselverschlechterung bis ins Präkoma, was Tagesharnzuckerausscheidungen und Blutzuckerprofile zahlenmäßig auswiesen. Zusatzbehandlung mit Kk.-Injektionen in kleinen Dosen (4 E jeden Tag oder jeden 2. Tag) sowie mit größeren Dosen per os (9—18 E) bei unveränderter Diät- und Insulineinstellung brachte, von einer Ausnahme abgesehen (s. unten), ebenfalls keine nachweisbare Beeinflussung des Kh.-Stoffwechsels. Auch zu diesen Versuchen wurden Diabetiker verschiedener Altersklassen und Typen herangezogen. Nur bei einem Zuckerkranken (Reg.-Nr. 8055), dessen an sich nicht schwerer Diabetes mit einer erheblichen allgemeinen Sklerose (Zerebralsklerose, schon zwei Apoplexien, periphere Durchblutungsstörungen) kombiniert ist, möchten wir einen durch zusätzliche perorale Kk.-Medikation bedingten gewissen Stoffwechseleffekt annehmen.

Zusammengefaßt scheint uns also das Kk. eine gewisse Stoffwechselwirkung im Sinne einer Erniedrigung des Blutzuckers zu zeigen; in der angewandten Dosierung übt es jedoch keinesfalls einen mit Insulin vergleichbaren Effekt aus, so daß es bei der jetzigen Konzentration zur Diabetesbehandlung an Stelle von Ins. — auch bei leichteren Fällen — nicht in Betracht kommt.

Wir möchten auf Grund unserer Versuchsergebnisse die Stoffwechselwirkung des Kk. nicht in einem Antagonismus zum Adrenalin, sondern eher in einer Beeinflussung der Kh.-Assimilation in der Peripherie sehen, die mit der Gefäßwirkung parallel geht, wie auch Fichera und Lanza[9,10] vermutet hatten. Daneben scheint uns ein besonderer Effekt bei solchen Kranken möglich, die im Rahmen einer Gefäßsklerose Durchblutungsstörungen mit Beeinflussung der Stoffwechselzentren haben. Eine solche Situation möchten wir bei den von Frey[1], Straube[8] und uns (Reg.-Nr. 8055) geschilderten Patienten mit besonders sinnfälliger Blutzuckerwirkung des Kreislaufhormons Kk. annehmen. Für derartige Diabetiker, die natürlich nur einen ganz geringen Prozentsatz ausmachen, dürfte eine Kk.-Therapie zur Stoffwechselbeeinflussung auch bei der jetzigen Konzentration des Präparates zum mindesten als Versuch berechtigt sein.

Aus der II. Medizinischen Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf
(Direktor: Prof. Dr. A. Jores).

Über die Wirkung des Nikotinsäureamids bei der Methylalkoholvergiftung der Ratte *.

Von

Heinrich Küchmeister.

(Eingegangen am 27. Dezember 1946.)

Der schädigende Wirkungsmechanismus des Methylalkohols ist noch nicht geklärt. Allgemein wurde früher angenommen, daß der Methylalkohol im Organismus langsam zu Ameisensäure oxydiert würde, und daß es durch die Ameisensäure im statu nascendi zur Schädigung der verschiedenen Organe, zu entzündlichen Magen-Darmstörungen und allgemein hyperämisch entzündlichen Zuständen, wie Bronchitis, Tracheitis, Bronchopneumonien (Rabinowitsch), Leberdegeneration, Nephritiden und trüber Schwellung des Herzens komme. Bei einem tödlich Vergifteten fand man im Blute Zunahme von Harnstoff, Kreatinin, Zucker, Phosphor und im Gewebe Formaldehyd (Lewin). Wieweit dieser Formaldehyd ein Umbauprodukt des Methylalkohols darstellt, bedarf weiterer Untersuchungen.

Wir bemühten uns nun, die Möglichkeiten der therapeutischen Beeinflussung durch experimentelle Studien mit Nikotinsäureamid zu erweitern. Im Nikobion der Firma Merck hatten wir ein brauchbares Präparat zur Verfügung.

Zur Methodik: Wir setzten 2 Versuchsreihen an. In der ersten gaben wir 5 Ratten gleichen Gewichts täglich Nikobion in therapeutischer Dosis intraperitoneal, d. h. 0,4 ccm einer 1:10 verdünnten Lösung. Nach 10tägiger Vorbehandlung bekamen die Ratten täglich 0,1 ccm Methylalkohol einer 1:4 verdünnten Lösung, entsprechend der Giftwirkung von 10 g des erwachsenen Menschen. Zugleich setzten wir 5 Kontrolltiere gleichen Gewichts und bei gleicher Kost an, die nicht vorbehandelt, die gleiche Menge Methylalkohol täglich erhielten. Es zeigte sich, daß die vorbehandelten Tiere durchschnittlich 3 Tage länger als die unvorbehandelten lebten.

Eine 2. Serie setzten wir daraufhin an, in der wir 10 Ratten täglich 0,1 ccm einer 1:8 verdünnten Methylalkohollösung injizierten und 5 von ihnen zugleich mit Nikobion zu schützen versuchten. Die geschützten Ratten überlebten bis auf 1 Ratte, welche an einer interkurrenten

* Nach Untersuchungen, die in der I. Med. Univ.-Klinik Wien, durchgeführt wurden.

Erkrankung zugrunde ging, die ungeschützten, starben aber dann doch alle 10—13 Tage später als diese, die nach durchschnittlich 17 Tagen eingingen.

Die histologische Untersuchung der Organe ergab insofern Unterschiede zwischen den geschützten und ungeschützten Tieren, als die Zeichen der serösen Entzündung, wie sie Eppinger beschrieben hat, bei den geschützten trotz der längeren Lebensdauer weniger ausgeprägt in die Augen fielen. Es schien von vornherein ein größerer Zellschaden verhindert zu sein. Das von Eppinger mitgeteilte Bild zeigte sich uns am deutlichsten an der Leber.

Aus der Blutbahn tritt durch die abnorm durchlässig gewordene Kapillarwand eine Menge Serumeiweiß aus, die Disseschen Räume erweitern sich. Wir fanden dort ein eiweißreiches Ödem. Durch die Beeinflussung des Serumeiweißes auf die Parenchymzellwand kommt es zur weiteren Schädigung, zum Einreißen der Zellbalken, zum Eintreten des Ödems in die Zwischenräume, die schließlich auch Erythrozyten und Kupfersche Sternzellen enthalten und mit den zugrunde gegangenen Leberzellen das Bild des Blutsees bieten. Bei chronischer Schädigung fällt an der Läppchenperipherie Fibrin aus und in nekrotische Leberpartien wandern Fibroblasten ein. Es kommt zur Bildung von jungem Bindegewebe und zu Gallengangswucherungen, zu Regenerationsprozessen, zu lymphozytären Infiltraten in den Periportalfeldern und zur Quellung der Kupferschen Sternzellen. Bindegewebswucherung und Regeneration führen allmählich so zu einem Umbau der Leber, der ein der menschlichen Leberzirrhose ähnliches Bild bewirkt.

Die Veränderungen der akuten Schädigung, die vorwiegend an der Läppchenperipherie auftreten, waren bei unseren mit Methylalkohol vergifteten Tieren, wenn auch nicht hochgradig, so doch teilweise deutlich sichtbar. Die mit Nikotinsäureamid geschützten Tiere zeigten dagegen die Symptome der serösen Entzündung viel weniger ausgeprägt. Hier fanden wir eine ähnliche Wirkungsweise des Nikotinsäureamids, wie sie von Beiglböck und Bertschinger bei der Allylformiatvergiftung gefunden wurde: Verhinderung des Zellschadens und nicht erst eine Beeinflussung der Reparation. Schwieriger waren die histologischen Unterschiede im Gehirn nachzuweisen.

Wir knüpften daher noch eine Untersuchung der Organe an. Es wurden die einzelnen Organe jeder Ratte aller Versuchsserien bei weinsaurer Reaktion einer Wasserdampfdestillation unterworfen und die erhaltenen Destillate zur Anreicherung des Methylalkohols fraktioniert, bis schließlich je Organ ein Enddestillat von 2 ccm anfiel. Zwecks Abscheidung vorhandener Aldehyde und Glyzerin wurde eine der letzten Destillationen unter Zusatz von Natronlauge und Silbernitrat durchgeführt.

Dann wurden die Enddestillate nach Deniges auf Methylalkohol geprüft und fielen bei den unvorbehandelten Tieren der ersten Serie in Gehirn und Nieren positiv aus. In den Destillaten der Leber, Milz und Lunge ließ sich Methylalkohol nach Deniges dagegen nicht nachweisen.

Die quantitative Ermittlung des Methylalkohols in den Destillaten des Gehirns und der Nieren über das spezifische Gewicht und die Lichtbrechung ergab bei durchschnittlichem Gehirngewicht von 1,45 g fast gleiche Methylalkoholwerte von 9,2 mg, bei 1,4 g Nieren 14,2 mg. Es wurden dann bei diesen unvorbehandelten Tieren die Destillate sämtlicher Organe vereinigt und von diesen Lösungen fraktioniert nochmals je 2 ccm abdestilliert. Aus den Gesamtorganen von durchschnittlich 9,28 g ließen sich 26,6 mg Methylalkohol gewinnen.

Von den mit Nikobion vorbehandelten Tieren wurden jeweils sämtliche Organe gemeinsam auf Methylalkohol untersucht. Die gesamten Organe wurden bei weinsaurer Reaktion einer Wasserdampfdestillation unterworfen und die Destillate wie oben fraktioniert destilliert, bis schließlich je Versuchstier ein Enddestillat von 2 ccm anfiel.

Die qualitative Prüfung dieser Enddestillate auf Methylalkohol fiel nach Deniges positiv aus. Die quantitative Bestimmung erfolgte über die Ermittlung des spezifischen Gewichtes und der Lichtbrechung der Enddestillate. In durchschnittlich 7,8 g eines Gemisches von Gehirn, Leber, Milz, Nieren und Lunge ließen sich im Durchschnitt 29,7 mg Methylalkohol nachweisen.

Berechnet man die gesamte jeder Ratte injizierte Methylalkoholmenge, so kommt man bei den mit Nikotinsäureamid vorbehandelten durchschnittlich auf 400 mg und bei den unvorbehandelten auf 275 mg. Wenn wir also in den Organen der vorbehandelten Tiere eher höhere Werte nachweisen konnten, so sind sie im Verhältnis zu der größeren vertragenen Injektionsmenge um 30% niedriger als bei den unvorbehandelten Tieren.

Zusammengefaßt ergaben unsere Befunde eine „schützende" Wirkung des Nikotinsäureamids sowohl in der Vorbehandlung wie gleichzeitigen Applikationen der mit Methylalkohol vergifteten Ratten. Wenn auch damit für einen therapeutischen Effekt des Nikotinsäureamids bei der Methylalkoholvergiftung des Menschen noch nichts bewiesen ist und es weiterer experimenteller Untersuchungen bedarf, so erscheint uns doch ein Versuch mit Nikotinsäureamid bei der Methylalkoholvergiftung unter gleichzeitiger Berücksichtigung der sonst üblichen Behandlungsverfahren angezeigt.

Literatur.

Beiglböck u. Bertschinger: Wien. klin. Wschr. **1943**, 1. — Eppinger, H.: Seröse Entzündung. Wien: Springer 1935. — Kröhl: Arch. exper. Path. (D.) **72**, 444. — Langgaard, A.: Z. exper. Path. u. Ther. **13**, 20 (1913). — Lehnartz, E.: Chemische Physiologie. Berlin: Springer 1943. — Lewin: Gifte und Vergiftungen. Berlin: Stilke-Verlag 1929. — Pohl, J.: Arch. exper. Path. (D.) **31** (1893); **83** (1918). — Rabinowitsch: Arch. int. Med. (Am.) **1922**. — Rühl: Münch. med. Wschr. **1912 I**, 64. — Starkenstein, Rost, Pohl: Toxikologie. Wien u. Berlin: Urban & Schwarzenberg 1929. — Völtz: Biochem. Z. **1912**.

Aus der Abteilung für experimentelle Therapie der Medizinischen Fakultät der Universität Freiburg i. Br. (Leiter: Doz. Dr. P. Marquardt).

Die Blutdruckwirkung des Protocatechualdehyds der Protocatechusäure und des Vanillins.

Ein Beispiel für die Bedeutung der 1-, 3-, 4-Substitution am Benzolkern für die Blutdruckwirkung des Adrenalins.

Von

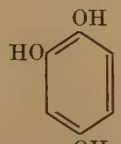
Peter Marquardt und Ruprecht Koch.

Mit 12 Textabbildungen.

(Eingegangen um 22. November 1946.)

In zwei vorhergehenden Mitteilungen[1,2] haben wir gezeigt, daß das Oxyhydrochinon im Gegensatz zu anderen einfachen Phenolen den Blutdruck der Katze und des Kaninchens steigert. Wir führten dies auf die 1-, 3-, 4-Substitution am Kern zurück, die der des Adrenalins entspricht. Mit dieser Beobachtung geraten wir in scheinbaren Widerspruch zu Mühlmann[3], Dakin[4], Barger und Dale[5] und Mulinos und Osborne[6], während wir die Angaben von Gibbs und Hare[7] bestätigen. Alle diese Autoren untersuchten mindestens eines der einfachen Phenole, nämlich das Brenzkatechin, und teilweise noch andere Phenole, meist im Hinblick auf das Adrenalinproblem. Diese Autoren nahmen stets als Grundkörper des Adrenalins das Brenzkatechin an. Dies erscheint gezwungen, womit nicht bestritten werden soll, daß aus Adrenalin Brenzkatechin als Abbauprodukt entstehen kann. Im Gegenteil! Der eine von uns zeigte selbst (Marquardt[8]), daß sich Differenzen in der Literatur durch die oxydative Entstehung von Phenolen, wie Brenzkatechin aus Adrenalin, aufklären lassen.

Wir sind der Ansicht, daß man dasjenige Phenolgrundskelett als einfache Vorstufe des Adrenalins ansehen muß, das in seiner Substitution am Kern dem Adrenalin entspricht, und dies ist das Oxyhydrochinon.

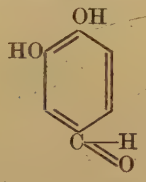


Oxyhydrochinon

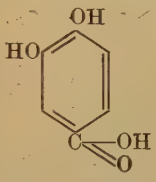
Tatsächlich weist das Oxyhydrochinon bereits eine adrenalinähnliche Wirkung auf[1,2]. Mit dieser Feststellung der Bedeutung der 1-, 3-, 4-

Substitution am Kern läßt sich die Behauptung von Mulinos und Osborne nicht in vollem Umfang aufrechterhalten, die der alleinigen Substitution bei 3 und 4 und einer zweigliedrigen Seitenkette (also auch 1, 3, 4!) die sympathikomimetrische Wirkung zuschreiben. Diese Autoren hätten unsere Resultate mit Sicherheit erhalten, wenn sie die einfachen Körper untersucht hätten. Die Seitenkette hat durchaus einen Einfluß (hierauf werden wir in einer späteren Mitteilung zurückkommen), aber nur quantitativ. Prinzipiell liegen die Dinge einfacher. Zum Beweise dieser unserer Auffassung sind wir jedoch noch weitere Experimente schuldig.

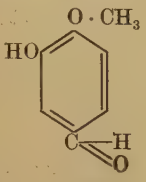
Wir stellten uns im folgenden die Frage, welche Wirkung Stoffe haben werden, die an Stelle der Substitution an 1 mit OH eine C-enthaltende Gruppe aufweisen. Hierfür kommen zunächst der Protocatechualdehyd und seine Säure in Frage, sowie in zweiter Linie das Vanillin. Wir stellen die Konstitutionsformeln der hier zur Frage gestellten Substanzen nebeneinander, um unseren Gedankengang zu zeigen.



Protocatechualdehyd



Protocatechusäure



Vanillin

Bei Durchsicht der Literatur zeigte es sich, daß weder Protocatechualdehyd, noch Protocatechusäure oder Vanillin auf ihre Blutdruckwirksamkeit untersucht worden sind.

Wie zu erwarten, zeigten diese drei Substanzen einen blutdrucksteigernden Effekt, der dem des Oxyhydrochinons gleicht, teils aber auch dem des Adrenalins ähnlich ist. Dieses Abweichen vom Adrenalin darf nicht weiter verwundern, da ja zur Genüge bekannt ist, daß andere adrenalinähnliche Substanzen, wie Ephedrin, Sympatol u. a., ebenfalls keinen dem Adrenalin absolut gleichenden Effekt aufweisen. Die Einzelheiten der Wirkung sind den folgenden Kurven zu entnehmen.

A. Vanillin.

Es zeigt sich hier ein Wirkungstypus der Blutdrucksteigerung, der dem des Oxyhydrochinons entspricht. In den meisten Fällen kommt es zu einer initialen Senkung nach intravenöser Injektion (Kaninchen und Katze), dann aber zu einem meist abrupten Ansteigen des Blutdruckes. Eine recht typische Kurve dieser Art zeigt die Abb. 1.

In kleineren Dosen zeigt sich mitunter die initiale Senkung nach Vanillin stärker ausgeprägt im Verhältnis zum nachfolgenden Anstieg. Abb. 2 und 3 zeigen die Kurven, bei denen in Abb. 2 die initiale Senkung

beinahe das ganze Geschehen am Blutdruck beherrscht, während in Abb. 3 zwar auch eine sehr erhebliche initiale Senkung besteht, der aber eine länger anhaltende Steigerung folgt. Beide Male wurden 40 mg Vanillin intravenös injiziert.

Abb. 1. Kaninchen 4,3 kg, Urethannarkose 1 g/kg, Atropin 2 mg/kg, Zeitschreibung 10 Sek.; bei *26* 80 mg Vanillin, *27* 10 γ Adrenalin intravenös und *0* Nullinie des Hg-Manometers.

Abb. 2. Kaninchen 4,3 kg, Urethannarkose 1 g/kg, Atropin 2 mg/kg, Zeitschreibung 10 Sek. *0* Nullinie des Hg-Manometers, bei *30* 40 mg Vanillin und *31* 1 γ Adrenalin.

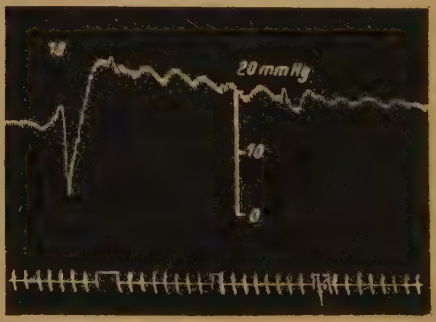


Abb. 3. Katze 2,3 kg, Pernoctonnarkose 0,5 ccm/kg, Atropin 2 mg/kg, Zeitschreibung 10 Sek. *0* Nullinie des Hg-Manometers bei *10* 40 mg Vanillin.

B. Protocatechualdehyd.

Protocatechualdehyd zeigt intravenös injiziert bei Kaninchen und Katzen ebenfalls einen blutdrucksteigernden Effekt, der dem des Oxyhydrochinons und des Vanillins sehr ähnlich ist. Das heißt, wir finden in den meisten Fällen die initiale Senkung post injectionem mit folgendem

Blutdruckanstieg, der erheblich länger andauert als beim Adrenalin. Mitunter findet man aber auch einen dem Adrenalin sehr ähnlichen Effekt. Abb. 4 zeigt die Blutdrucksteigerung nach Protocatechualdehyd ohne initiale Senkung.

In der Abb. 5 können wir dagegen einen Wirkungstyp des Protocatechualdehyds aufweisen, der die initiale Senkung deutlich erkennen läßt.

Es folgt auf diese eine langanhaltende Steigerung ($14^1/_2$ Min.). In dieser Versuchsanordnung wurde auch die Atmung mit Hilfe einer MARREYschen Kapsel im Nebenschluß einer Trachealkanüle mitgeschrieben. Sie ist über der Blutdruckkurve registriert und zeigt nach Protocatechualdehyd eine ebensolche Erregung wie nach Adrenalin, ja sie erscheint eher noch vertieft. Wie schon beim Oxyhydrochinon und Vanillin beschrieben, findet man auch beim Protocatechualdehyd zuweilen ein dem Adrenalin ähnliches Wirkungsbild. Hierfür bieten die Abb. 6 und 7 ein gutes Beispiel.

Abb. 4. Kaninchen 4,3 kg. Urethannarkose 1 g/kg, Atropin 2 mg/kg, Zeitschreibung 10 Sek. *0* Nullinie des Hg-Manometers bei *32* 80 mg Protocatechualdehyd.

C. Protocatechusäure.

Die Protocatechusäure zeigt qualitativ das gleiche Verhalten wie der Aldehyd, nur ist sie bei gleicher Dosierung quantitativ schwächer wirksam, wie dies in Abb. 8 und 9 sehr gut zu erkennen ist. Dieses Verhalten der Protocatechusäure ist auch nicht weiter verwunderlich, da dieselbe sicher als eine Stufe im Abbau des stärker wirkenden Aldehyds angesehen werden darf. Außerdem zeigt die Abb. 8 deutlich die Abnahme der Blutdruckwirkung über Adrenalin vom Protocatechualdehyd zur Protocatechusäure unter Berücksichtigung der entsprechenden Dosierung. Dies würde in

Übereinstimmung stehen mit der Vermutung von Weinstein und Manning[11] über das vermehrte Ausscheiden von Protocatechusäure nach Adrenalininjektion, wobei sie die Protocatechusäure als Abbauprodukt des Adrenalins ansehen.

D. Wirkungsumkehr.

Wir möchten nicht verfehlen, an Hand von Experimenten darauf hinzuweisen, daß ausnahmsweise neben der blutdrucksteigernden Eigenschaft dieser Körper auch eine Senkung auftreten kann. Wir konnten

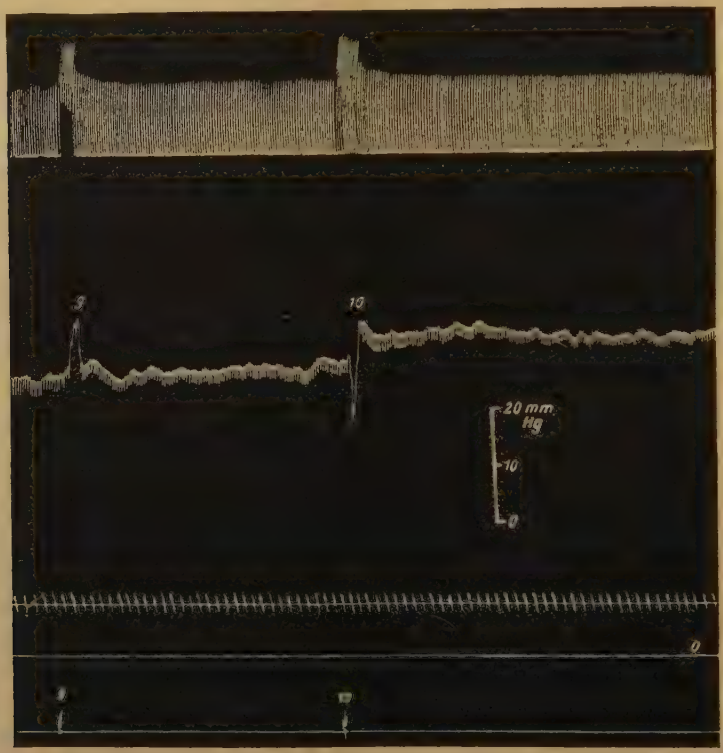


Abb. 5. Katze 3,4 kg, Pernoctonnarkose 0,5 ccm/kg, Atropin 2 mg/kg, Zeitschreibung 10 Sek. *0* Nullinie des Hg-Manometers bei *9* 10 γ Adrenalin (die Steigerung hält $14^1/_2$ Min. an), *10* 40 mg Protocatechualdehyd. (Obere Kurve Atmung wie im Text angegeben.)

fast regelmäßig beobachten, daß Tiere, die häufige Adrenalininjektionen intravenös erhalten hatten, nach Protocatechualdehyd, -säure und Vanillin nicht mit einer Blutdrucksteigerung antworteten, sondern mit einer Senkung. Des öfteren hatten die genannten Substanzen aber vorher am gleichen Tier einen positiven Ausschlag gezeigt. Diese Eigenschaft der Substanzen erinnert im höchsten Maße an die gleiche Eigenschaft der zugehörigen Phenolgrundskelette, wie sie von Marquardt[9] für die

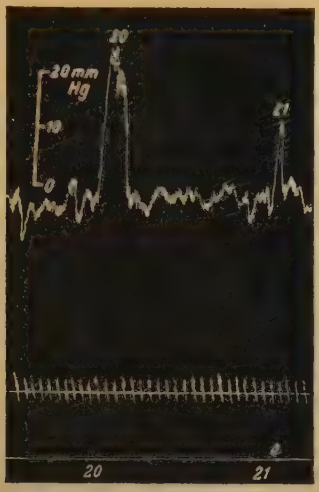


Abb. 6. Katze 2,4 kg, Pernoctonnarkose 0,5 ccm/kg, Atropin 2 mg/kg, Zeitschreibung 10 Sek. *0* Nullinie des Manometers, bei *20* 8 γ Adrenalin, *21* 40 mg Protocatechualdehyd.

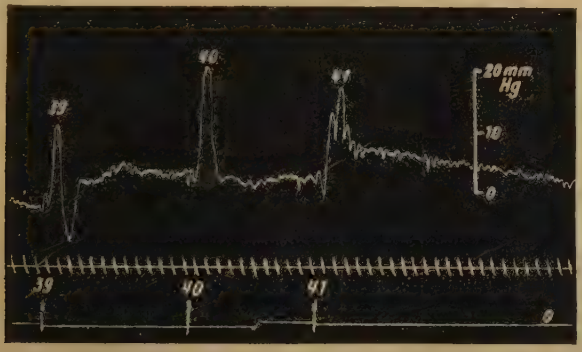


Abb. 7. Kaninchen 4,3 kg, Urethannarkose 1 g/kg, Atropin 2 mg/kg, Zeitschreibung 10 Sek. *0* Nullinie des Hg-Manometers, bei *39* 20 mg Oxyhydrochinon, *40* 4 γ Adrenalin und *41* 40 mg Protocatechualdehyd.

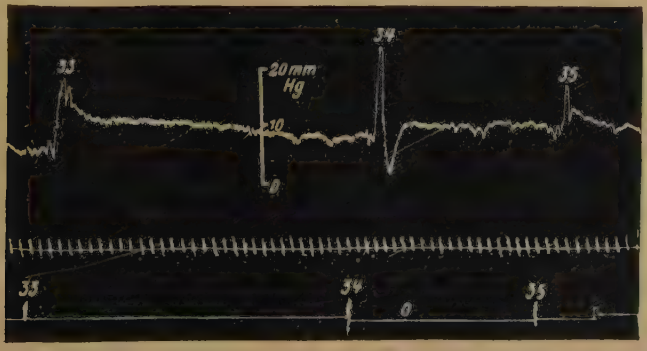


Abb. 8. Kaninchen 4,3 kg, Urethannarkose 1 g/kg, Atropin 2 mg/kg, Zeitschreibung 10 Sek. *0* Nullinie des Hg-Manometers, bei *33* 40 mg Protocatechualdehyd, *34* 4 γ Adrenalin und *35* 40 mg Protocatechusäure.

Phenole beschrieben wurden. Die Literatur über die gleiche Eigenschaft einiger Sympathikomimetika findet sich bei KIESE[10]. Diese Wirkungsumkehr ist keineswegs nur eine Verstärkung der initialen

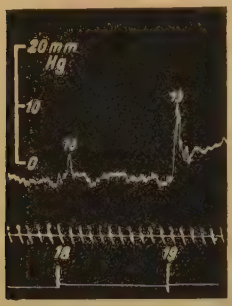


Abb. 9. Kaninchen 3,1 kg, Urethannarkose 1 g/kg, Atropin 2 mg/kg, Zeitschreibung 10 Sek. *0* Nullinie des Hg-Manometers bei *18* 40 mg Protocatechusäure bei *19* 40 mg Protocatechualdehyd.

Abb. 10. Katze 3,9 kg, Pernoctonnarkose 0,5 ccm, Atropin 2 mg/kg, Zeitschreibung 10 Sek. *0* Nullinie des Hg-Manometers bei *21* 20 mg Oxyhydrochinon.

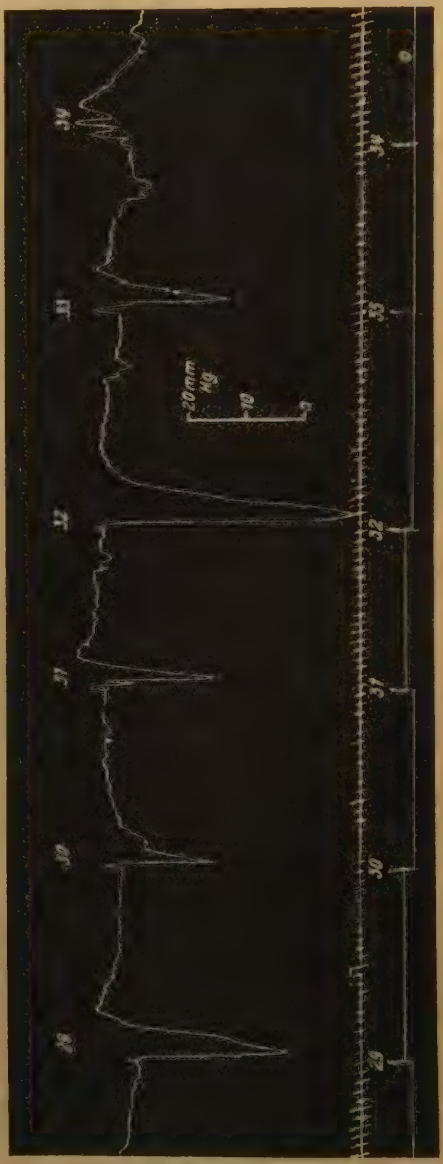


Abb. 11. Dasselbe Tier in gleicher Anordnung, nach einer Reihe von Adrenalininjektionen. Bei *29* 40 mg Vanillin, *30* 40 mg Protocatechualdehyd, *31* 40 mg Protocatechusäure, *32* 0,25 mg Acetylcholin und *33* 20 mg Oxyhydrochinon.

Senkung, wie man leicht annehmen könnte. In Abb. 10 z. B. reagiert das Versuchstier vollkommen normal, in Abb. 11 dagegen zeigt dasselbe Tier eine

„paradoxe Reaktion", nachdem es vorher eine ganze Reihe Adrenalininjektionen erhalten hatte. Die Kurve beginnt hier, im Gegensatz zum normalen

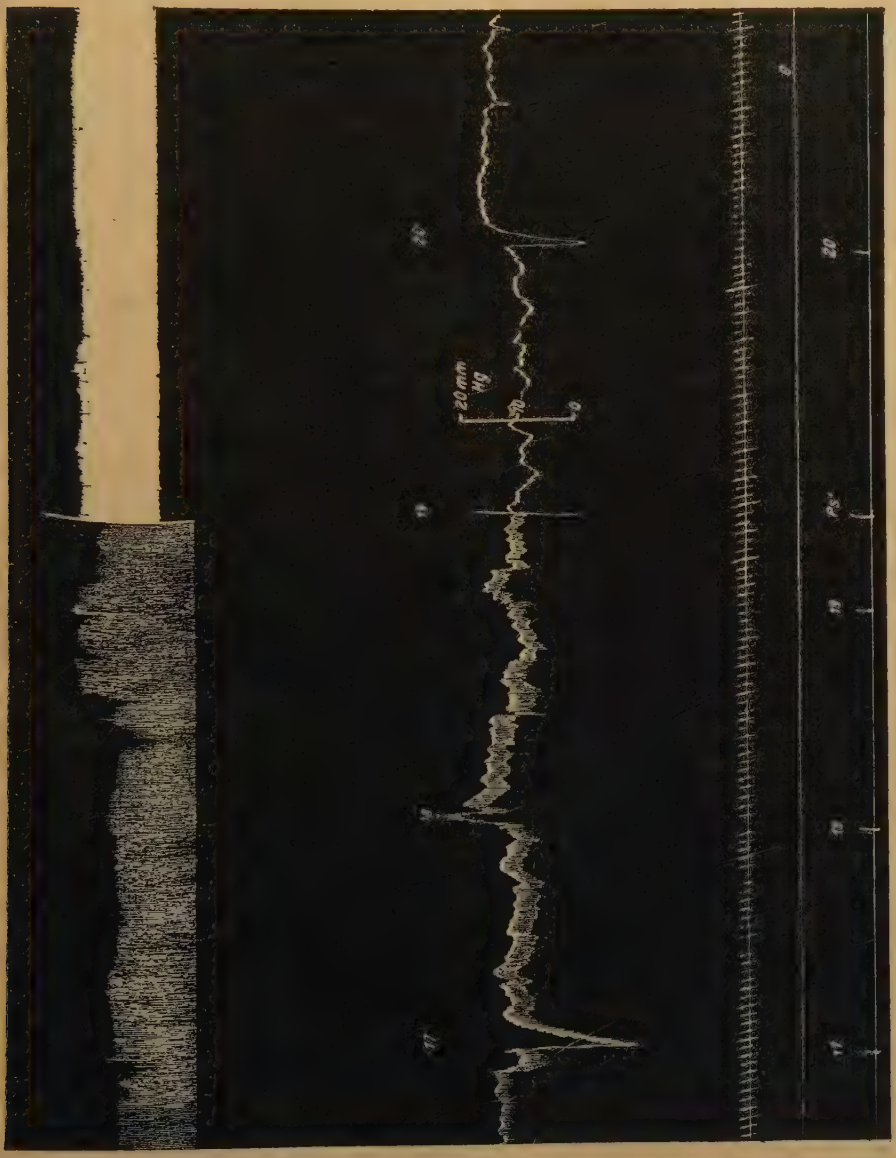


Abb. 12. Katze 3,4 kg, Pernoctonnarkose 0,5 ccm/kg, Atropin 2 mg/kg, Zeitschreibung 10 Sek. *0* Nullinie des Hg-Manometers, bei *17* 40 mg Vanillin, *18* 10 γ Adrenalin und *20* 40 mg Vanillin. *Ps'* 6 Min. Pause, bei *19* Injektion einer adrenalinhaltigen Lösung. (Obere Kurve stellt die Atmung dar. Anordnung wie in Abb. 5.)

Wirkungstyp, mit einer initialen Blutdrucksteigerung! Denselben Reaktionswechsel, ebenfalls für das Vanillin, zeigt sehr schön die Abb. 12. Das Tier hatte vor der ersten Vanillingabe eine ganze Reihe Adrenalininjektionen

erhalten. Darauf reagierte es zunächst bei der ersten Gabe mit einer paradoxen Reaktion, nach einer Weile, etwa 10 Min. später, zeigte sich zwar immer noch eine starke Senkung, die aber von einer anhaltenden Steigerung gefolgt war, so daß wir hier von einer initialen Senkung sprechen können, während im ersten Fall eine echte paradoxe Reaktion vorlag.

Die Tatsache solcher paradoxen Reaktionen hat, wie wir eingangs ausführten, die Untersuchung in dieser Stoffklasse sehr erschwert, und nur großes Material und die Versuchsbedingungen, wie sie der eine von uns (Marquardt) in seiner Arbeit über die Wirkung der Phenole ausführte, gestatten es, eindeutige Schlüsse zu ziehen.

E. Schlußfolgerungen.

Unsere Untersuchungen bringen weitere Beweise einer Gesetzmäßigkeit für die Substitution am Benzolkern und ihre Bedeutung für die pharmakologische Wirkung. Wir sind uns durchaus bewußt, daß diese Regel auf die adrenalinähnlichen Körper nicht einfach übertragen werden kann. Sie gilt eben bisher nur für die einfacheren Phenole.

An Hand der Wirkungen des Vanillins, der Protocatechusäure und des Aldehyds kann unsere Ansicht, daß das Oxyhydrochinon das Grundskelett des Adrenalins ist, nicht nur chemisch, sondern auch pharmakologisch wahrscheinlich gemacht werden. Alle bisher von uns untersuchten einfachen Körper mit 1-, 3-, 4-Substitution erhöhen den Blutdruck.

Zusammenfassung.

Es wird an Hand von Kurven die blutdrucksteigernde Wirkung des Protocatechualdehyds, der Protocatechusäure und des Vanillins nachgewiesen und auf die gleiche Eigenschaft des Oxyhydrochinons verwiesen. Konstitution, Blutdruckeffekt und „paradoxe Reaktion" der genannten Substanzen weisen darauf hin, daß es sich um Stoffe der Adrenalinreihe handelt. Außerdem wird gezeigt, daß bei dem Abbau des Protocatechualdehyds zur -säure im Organismus auch die Blutdruckwirksamkeit abnimmt.

Literatur.

[1] Marquardt, P.: Klin. Wschr. **1944**, 167. — [2] Marquardt, P. u. R. Koch: Z. exper. Med. **113** (1944). — [3] Mühlmann: Dtsch. med. Wschr. **1896 I**, 22, 409. — [4] Dakin: Proc. roy. Soc., Lond., Ser. B.: Biol. Sci. **1905**, 76, 498. — [5] Barger u. Dale: Z. Physiol. **1910**, 19, 41. — [6] Mulinos and Osborne: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **32**, 1344—1346 (1934/35). — [7] Gibbs u. Hare: Dubois Arch. Physiol. **1890**, 352. — [8] Marquardt, P.: Arch. exper. Path. (D.) **199**, 554 (1942). — [9] Marquardt, P.: Arch. exper. Path. (D.) **201**, 234—241 (1943). — [10] Kiese: Kurse ärztl. Fortbildung **23**, 6 (1942). — [11] Weinstein u. Manning: Science **86**, 19, 20 (1937).

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Greifswald
(Direktor: Prof. Dr. F. A. Hoppe-Seyler †).

Untersuchungen über Cholinesterase im Blut nach experimentellen Schädigungen.

III. Mitteilung.

Verhalten der Cholinesterase im Blut von Hunden bei experimenteller Verbrennung.

Von

Norbert Schümmelfeder.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. Dezember 1946.)

Nach schweren Verbrennungen der Haut, Unterhaut und Muskulatur kommt es beim Menschen und den Versuchstieren — unter Umständen innerhalb der ersten und zweiten Stunde — zum raschen Abfall des Blutdrucks bis zum tödlichen Kollaps bei stärkerem Anstieg der Körpertemperatur. Dieser „Frühschock", bei dem die Hyperthermie vermutlich eine erhebliche Rolle spielt, muß unterschieden werden von dem „Spätschock", welcher als Folge ausgedehnter, aber nicht unmittelbar tödlicher Verbrennungen erst nach längerer Zeit, beim Menschen häufig erst am zweiten oder dritten Tag nach der Schädigung auftritt, und für dessen Zustandekommen die Proteolyse der geschädigten Gewebe und andere Abbauvorgänge, Resorption von Abbauprodukten und unter Umständen Infektionsfolgen anscheinend eine wesentlich stärkere Rolle spielen, als bei den starken, rasch tödlich wirkenden Verbrennungen.

Angaben darüber, ob für diese Zustände Änderungen der Cholinesteraseaktivität (EA) im Blut und Serum eine Rolle spielen, fehlen ganz, soweit wir es übersehen können.

In der vorliegenden Mitteilung wird über Versuche berichtet, in denen das Verhalten der EA im Vollblut und Serum von Hunden vor und während des „Frühschocks" im Verlaufe schwerer, tödlich wirkender experimenteller Verbrennungen geprüft wurde.

Methodik.

Über Technik und Genauigkeit der Esterasebestimmung (potentiometrische Titration der aus Azetylcholin abgespaltenen Essigsäure an der niederohmigen Glaselektrode) wurde bereits berichtet[1]. Wir zeigten damals, daß eine Einwirkung der Pernocton- bzw. Pernocton-Chloralosenarkose zu einem Rückgang der EA im Serum führt, welcher sich so rasch wieder ausgleicht, daß Störungen der Versuchsanordnung

[1] Schümmelfeder, N.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 454 (1947) (I. Mitt.).

bei mehrstündig bestehender Narkose nicht zu befürchten sind. Auch die zur Freilegung von Blutgefäßen notwendigen, bei jedem Versuch in ziemlich gleicher Weise wiederkehrenden operativen Eingriffe führten zu keinen nennenswerten Änderungen der EA.

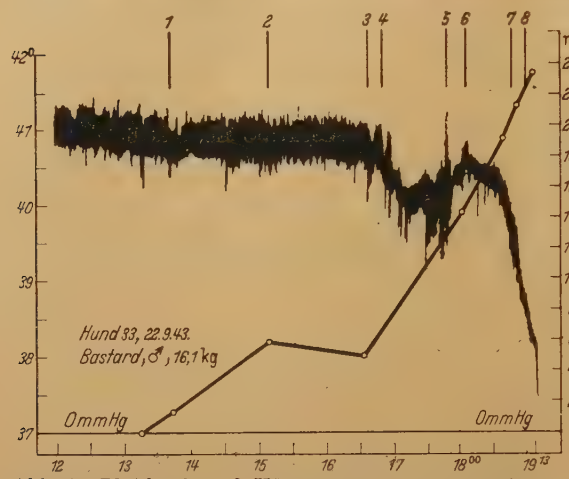


Abb. 1. Blutdruck und Körpertemperatur bei örtlicher Verbrennung. o——o Rektaltemperatur, oben arterieller Blutdruck; *1, 2, 3, 7, 8* Blutentnahmen aus der Arteria brachialis li.; *4* Beginn der Verbrennung beider Hinterbeine; *6* Verstärkung der Beheizung; *5* intravenöse Injektion von Chloralose.

Die Verbrennungsversuche wurden an 4 Hunden (Gewicht 14—22,5 kg) in Pernocton-Chloralosenarkose ausgeführt. Die Verbrennungen setzten wir regelmäßig an den vorher geschorenen Innen- und Außenseiten beider Hinterbeine, indem Heizsonnen von 500 Watt bzw. 2 Glühlampen von 200 oder 250 Watt im Abstand von 10—20 cm bis zum Tode dauernd einwirkten. In allen Fällen kam es rasch zum Absinken des Blutdrucks und innerhalb von 2—3 Stunden zum tödlichen Kollaps. Die Rektaltemperatur stieg in allen Versuchen bis auf etwa 42°. Das Beispiel einer typischen Blutdruck- und Temperaturkurve wird in Abb. 1 wiedergegeben.

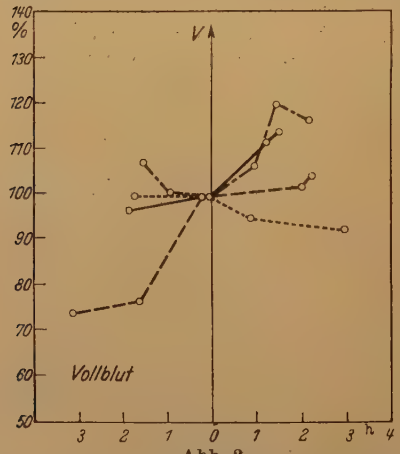


Abb. 2.

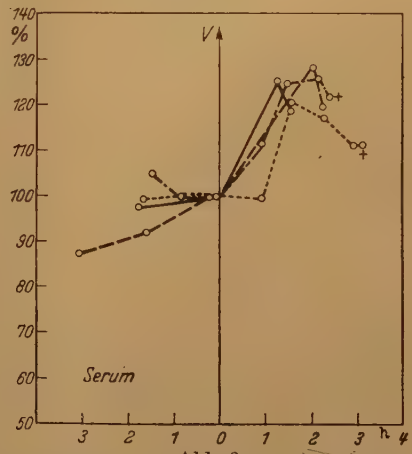


Abb. 3.

Abb. 2 u. 3. Cholinesterase des Blutes und Serums bei örtlicher Verbrennung. o——o Hund 32, o— — —o Hund 33, o— · —o Hund 46, o· · · · · · o Hund 47, + nach dem Tod entnommene Blutproben, *V* Beginn der Verbrennung.

Zu Blutentnahmen, Injektionen und Blutdruckmessung wurden Arteria und Vena brachialis li. und Arteria carotis re. freigelegt und in ihre zentralen Stümpfe Metallkanülen eingebunden. Die Größe der einzelnen Blutentnahmen lag zwischen

25 und 50 ccm. Die ersten Kubikzentimeter Blut jeder Entnahme wurden verworfen. Entsprechend der Schwere der Verbrennungsschäden zeigte sich in den Blutproben im Laufe der Versuche zunehmende Hämolyse. Die Auswertungen führten wir teils im hämolysierten Vollblut, teils im Serum durch. Der Karotisblutdruck wurde während des einzelnen Versuchs laufend registriert.

Die Versuchsergebnisse sind in den Abb. 2 und 3 wiedergegeben.

Die im Vollblut (Abb. 2) beobachteten Änderungen der EA waren, aus den bereits früher dargelegten Gründen[1], weniger gleichmäßig und nicht so einfach deutbar, wie die im Serum. Mit Ausnahme eines Falles (Hund 47) wurden im Vollblut Steigerungen während der Verbrennung gefunden; in einem dieser Versuche (Hund 33) lag die eigentliche Steigerung jedoch schon vor Beginn der Schädigung. Hund 47 zeigte während der Verbrennung eine leichte Senkung der EA im Vollblut.

Im Serum (Abb. 3) kam es dagegen in allen Fällen zu Anstiegen der EA (21—29%). Die höchsten Werte wurden eine, spätestens zwei Stunden nach Beginn der Verbrennung gefunden. In der dritten Stunde und bis zum Tod sanken die Werte regelmäßig wieder etwas ab. In dieser Beziehung ist der Kurvenverlauf abweichend von dem nach Erfrierungen[2] und während des Entblutens[1], bei denen in der Regel die letzten Blutproben vor und nach dem Tod die höchsten Werte gaben.

Besprechung.

Hinzuweisen ist besonders auf die Versuche von Frommel und Mitarb.[3], die im traumatischen Schock (Zertrümmerung der Muskulatur an den Hinterbeinen) und nach starker Nervenreizung (Quetschung des Nervus ischiadicus) beim Meerschweinchen ohne Narkose erhebliche Senkungen der EA im Serum beobachteten. Am narkotisierten Meerschweinchen war der Effekt nur gering. Demnach ändert sich die EA nach Trauma und Nervenreizung im Blut entgegengesetzt wie im Verbrennungs- bzw. Hyperthermieschock, sofern man die an Hunden erhaltenen Ergebnisse mit den an Meerschweinchen gefundenen vergleichen kann. In orientierenden Versuchen fanden wir aber auch am narkotisierten Hund nach einseitiger oder beidseitiger Zertrümmerung der Adduktorenmuskulatur eine deutliche Abnahme der EA.

Wie bei den nach Erfrierungen beobachteten Anstiegen kann die Steigerung der EA im Blut und Serum während der Verbrennungsversuche verschieden gedeutet werden: 1. als Zeichen einer Fermentabgabe aus den geschädigten Geweben bzw. einer Abgabe von Aktivatoren an das Blut, 2. als Zeichen einer kreislaufregulatorischen Funktion der Cholinesterase des Blutes im Sinne einer Gegenregulation: höhere EA, dadurch bedingte schnellere Spaltung des Azetylcholins an den cholinergischen Dilatatoren

[2] Schümmelfeder, N.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 466 (1947). (II. Mitt.).
[3] Frommel, E., M. Thalheimer, A. D. Herschberg u. J. Piquet: Helvet. physiol. Acta **1**, 451 (1943).

der Gefäße und somit Verhinderung oder zumindest Abschwächung einer Blutdrucksenkung. Diese Gegenregulation würde allerdings im Gegensatz zu den Erfrierungsversuchen hier schnell versagen. Pirolli[4] nimmt bei den durch ihn festgestellten Steigerungen der EA nach schweren Blutungen eine derartige Gegenregulation an. Gegen die Annahme einer Ausschwemmung von Gewebsesterase in das Blut spricht die Tatsache des Absinkens der EA in der dritten Stunde nach Beginn der Verbrennung. Es wäre dann doch aller Wahrscheinlichkeit nach ein ähnliches Bild zu erwarten gewesen, wie es die proteolytischen Fermente nach entsprechender Gewebsschädigung zeigen: Zunahme der Fermente im Blut im Verlauf der Versuche, Höhepunkt des Fermentgehaltes im Blut erst innerhalb einiger Tage nach dem schädigenden Eingriff (Pfeiffer[5]).

Wir fanden im Verlauf der Verbrennung eine immer stärker werdende Hämolyse. Es muß also berücksichtigt werden, daß die Steigerung im Serum auch beruhen könnte auf einem Übertritt von Erythrozytenesterase in das Serum (Trowbridge[6]), jedoch spricht hiergegen der Nachweis einer Steigerung der EA auch im Vollblut während dreier Versuche.

Befunde, nach welchen die Cholinesterasewirksamkeit infolge erhöhter Empfindlichkeit des zentralen oder autonomen Nervensystems — bei Depressionen und Ängstlichkeitszuständen (Richter und Lee[7], Tod und Jones[8], starker Muskelarbeit (Richter und Croft[9], Hyperthyreoidismus (Antopol, Tuchmann und Schifrin[10]) — verstärkt ist, läßt auch daran denken, daß es in unseren Versuchen entweder durch Hyperthermie oder Veränderungen der Blutzusammensetzung zu einer zentral- bzw. autonomnervösen Übererregbarkeit mit Steigerung der EA kommen könnte.

Bis zu einem gewissen Grade machen übrigens unsere Versuche, in denen Steigerungen der Aktivität der Serumesterase gefunden wurden, es wenig wahrscheinlich, daß eine Zunahme von freiem, pharmakologisch wirksamem Bluthistamin bei der beobachteten Schockform eine Rolle spielt. Nach Versuchen an Meerschweinchen wird nämlich die Serumesterase in vivo und in vitro durch Histamin erheblich gehemmt (Frommel und Mitarb.[11]).

Zusammenfassung.

An 4 Hunden wurde die Änderung der EA im Vollblut und Serum während starker, rasch zum Tod führender Verbrennungen geprüft. Die Ergebnisse im Vollblut waren schwankend, jedoch wurden in zwei Versuchen eindeutige Steigerungen gefunden. Im Serum kam es dagegen in allen Fällen zu einem Aktivitätsanstieg um 21—29%.

[4] Pirolli, M.: Cuore **25**, 414 (1941). — Boll. Soc. ital. Biol. sper. **17**, 437 (1942). — [5] Pfeiffer, H.: Krkh.forsch. **1**, 407 (1925). — [6] Trowbridge, C.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **47**, 519 (1941). — [7] Richter, D. u. M. Lee: J. ment. Sci. **88**, 428, 435 (1942). — [8] Tod, H. u. Maxwell Shaw Jones: Edinbgh med. J. **44**, 46 (1937). — [9] Richter, D. u. Ph. G. Croft: J. Physiol. (Brit.) **101**, 9 (1942). — [10] Antopol, W., L. Tuchmann u. A. Schifrin: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **36**, 46 (1937). — [11] Frommel, E., E. Aron, A. D. Herschberg, J. Piquet u. A. Goldféder: Helvet. physiol. Acta **2**, 111 (1944).

Froschherzversuche mit rasch variablen Kohlensäure-Bikarbonatgemischen.

Von

Leopold Ther.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. Januar 1947.)

In einer vorausgegangenen Arbeit[1] wurde darauf hingewiesen, daß der Wirkungswandel des Adrenalins, wie er sich am überlebenden Uterus einiger Tierspezies kundtut, wahrscheinlich auf Stoffwechselvorgänge im Organ zurückzuführen ist. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche am überlebenden Froschherzen galten der Feststellung, in welcher Weise die Wasserstoff- bzw. Karbonat-Ionen die Adrenalinwirkung verändern. Die Adrenalinwirkung auf ein mit Kohlensäure vorbehandeltes Herz zu prüfen, schien nach Untersuchungen von Salant und Johnston[2] deshalb interessant zu sein, weil nach diesen Forschern Adrenalinkonzentrationen, die bei einem p_H von 7,9—6,9 deutlich kontraktionsverstärkend wirken, bei saurer Reaktion weniger stark, ja sogar deprimierend wirken sollen.

Die Untersuchungen an isolierten Temporarien- und Eskulentenherzen erfolgten nach der Methode von Amsler[3] in den Wintermonaten 1943/44 und im Sommer 1944. Durch die Suspensionsflüssigkeit ($NaHCO_3$ 1,0, $CaCl_2$ 0,1, KCl 0,1, NaCl 6,0 und Aqu. dest. ad 1000) wurden Sauerstoff-Kohlensäuregemische geleitet, um während der einzelnen Versuche eine rasche Variation der Wasserstoffionenkonzentration von $1 \cdot 10^{-8}$ bis $1 \cdot 10^{-6}$ zu erhalten. Die Gemische wurden mit Hilfe einer Apparatur hergestellt, die eine Kombination des von Barkan, Broemser und Hahn[4] angegebenen Verfahrens mit der von Cobet[5] beschriebenen Methode darstellt. Da dieses einfache Verfahren das Arbeiten mit Sauerstoff-Kohlensäuregemischen sehr leicht gestaltet, sei es kurz dargestellt. Die theoretischen Grundlagen hierzu sind bei Michaelis[6] und Barkan, Broemser und Hahn[4] nachzulesen.

I. Apparat zur Herstellung verschiedener Kohlensäure-Bikarbonatpuffergemische (vgl. Abb. 1).

Aus einer Bombe strömt Sauerstoff durch eine Gasuhr und wird so eingestellt, daß 3 Liter Sauerstoff in 6—12 Min. durch einen Schenkel eines Zweiweghahnes (D_1)

[1] Ther: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 414 (1947). — [2] Salant u. Johnston: J. Pharmacol. (Am.) **23**, 371 (1924). — Zit. nach Komiyama: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **139**, 100 (1929). — [3] Amsler: Zbl. Physiol. **31**, 467 (1916). — [4] Barkan, Broemser u. Hahn: Z. Biol. **74**, 1 (1921). — [5] Cobet: Biochem. Z. **137**, 73 (1923). — [6] Michaelis: Die Wasserstoffionenkonzentration. Berlin: Springer 1930.

in das Kohlensäure-Sauerstoffmischgefäß (M) gelangen, welches aus einer mit einem dreifach durchbohrten Gummistopfen verschlossenen 2-Literflasche besteht, die 200 ccm verdünnte Schwefelsäure enthält. Von 2 MARIOTTEschen Flaschen (1 Liter), von denen die eine (N_1) mit 2,1 %iger, die andere (N_2) mit 8,4 %iger Natriumbikarbonatlösung gefüllt ist, führen abklemmbare Gummischläuche zu einem Stalagmometer (St).

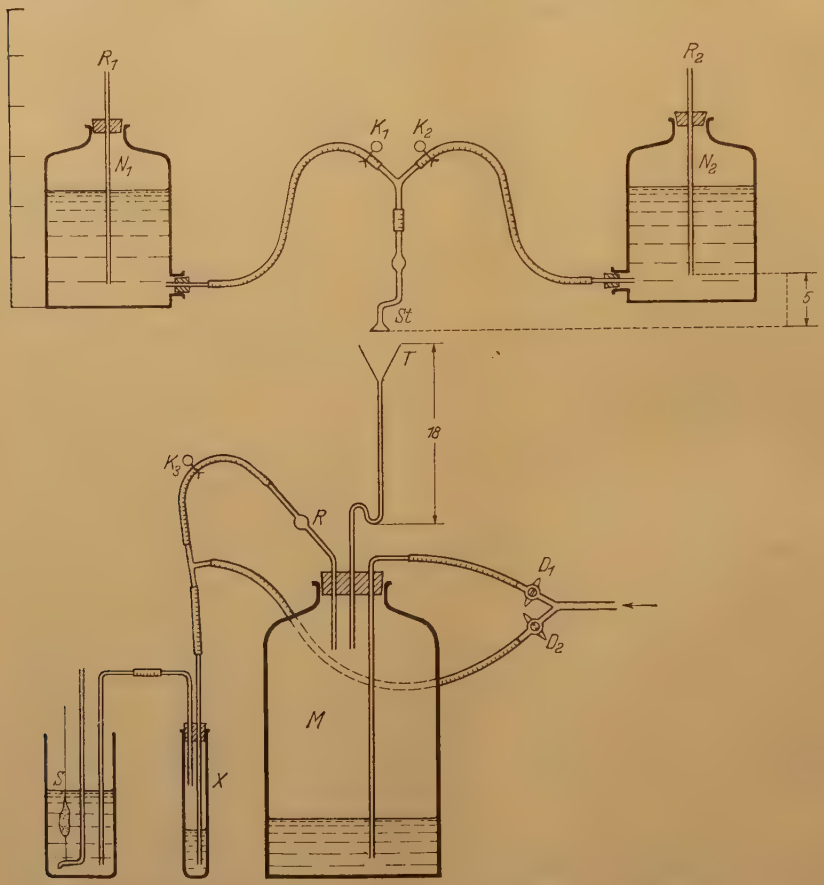


Abb. 1. Apparat zur Herstellung von Kohlensäure-Bikarbonat-Puffergemischen.

Sobald eine der beiden Klemmen (K_1 oder K_2) geöffnet wird, fallen Tropfen von konstanter Größe durch ein Trichterchen (T) in die Schwefelsäure des Mischgefäßes (M), wo Kohlensäure entwickelt wird. Das Ausflußrohr des Trichterchens ist knieförmig gebogen und zwischen dem oberen Trichterrand und dem untersten Punkt des Knies ein Abstand von 18 cm gewählt, damit der Druck einer genügend hohen Flüssigkeitssäule, die sich beim Eintropfen in diesem Teil des Trichterchens ansammelt, dem Innendruck des Mischgefäßes (M) das Gleichgewicht hält und ein Entweichen des Gasgemisches auf diesem Wege verhindert. Das Kohlensäure-Sauerstoffgemisch gelangt durch ein Glasrohr (R), das an einer Seite kolbenförmig aufgeblasen ist, in ein mit einem Gummistopfen verschlossenes Reagenzgläschen (Indikatorröhrchen X),

welches mit 1,5 ccm 0,3%iger m-Nitrophenollösung und 4,0 ccm Suspensionsflüssigkeit gefüllt ist. Von hier aus führt eine Zuleitung den Gasstrom in das Suspensionsgefäß (S).

Die Tropfenzahl aus dem Stalagmometer konnte durch Verstellen der MARIOTTEschen Flasche variiert werden, so daß auf 3 Liter Sauerstoff stets die gleiche Anzahl Tropfen in die Schwefelsäure fiel, gleichgültig, ob der Sauerstoff in 6 oder 9 Min. durch die Gasuhr und die Apparatur lief. Bei der tiefsten Einstellung betrug der Höhenunterschied zwischen Abreißfläche des Stalagmometers und dem unteren Ende der Glasröhrchen in den MARIOTTEschen Flaschen (R_1 und R_2) 5 cm; hierbei fielen 25 Tropfen in 7 Min. Wurden die Flaschen 25 cm höher gestellt, so fielen in gleicher Zeit 300 Tropfen. Die Tropfengröße änderte sich dabei nur geringfügig, so daß dieser Fehler vernachlässigt werden konnte. Der für eine bestimmte Tropfgeschwindigkeit jeweils erforderliche Höhenunterschied wurde an Hand einer zuvor aufgenommenen Eichkurve eingestellt.

Nach BARKAN, BROEMSER und HAHN[4] ist zur Herstellung einer Wasserstoffionenkonzentration von $2{,}1 \cdot 10^{-8}$ in einer Suspensionslösung mit 0,1% Natriumbikarbonat ein Gasgemisch notwendig, dessen CO_2-Partialdruck über der Bikarbonatlösung 22 mm Hg beträgt. Bei der oben beschriebenen Apparatur erfüllte eine 2,1%ige Bikarbonatlösung diese Forderung, wenn 75 Tropfen (10 ccm der Lösung) in die Schwefelsäure fielen, während 3 Liter Sauerstoff durch das Mischgefäß strömen. Die 4fache Tropfenzahl (300 Tropfen) dieser 2,1%igen Lösung auf 3 Liter Sauerstoff erhöhte die Wasserstoffionenkonzentration auf $[H^+] = 8{,}8 \cdot 10^{-8}$. Um weitere Steigerungen der $[H^+]$ zu erzielen, wurde in der zweiten MARIOTTEschen Flasche die Konzentration der Bikarbonatlösung auf 8,4% erhöht. Die nachstehende Tabelle gibt die theoretisch errechneten und praktisch gefundenen Wasserstoffionen-Konzentrationswerte wieder.

Tabelle 1.

Anzahl der Tropfen	Konzentration der Bikarbonatlösung in der MARIOTTEschen Flasche	Berechnete Werte der $[H^+]$	Gemessene Werte der $[H^+]$
75	2,1%	$2{,}1 \cdot 10^{-8}$	$2{,}5 \cdot 10^{-8}$
150		$4{,}2 \cdot 10^{-8}$	$5{,}0 \cdot 10^{-8}$
300		$8{,}8 \cdot 10^{-8}$	$10{,}0 \cdot 10^{-8}$
150	8,4%	$1{,}8 \cdot 10^{-7}$	$2{,}5 \cdot 10^{-7}$
300		$3{,}6 \cdot 10^{-7}$	$5{,}0 \cdot 10^{-7}$

Die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration in dem Röhrchen X erfolgte durch Vergleich mit einer Reihe gleicher Reagenzgläser mit verschiedenen Phosphatpuffern $\left(\frac{\text{mol}}{15}\ KH_2PO_4 \text{ und } Na_2HPO_4\right)$ nach MICHAELIS[6], die in einem Gesamtvolumen von 11 ccm 3 ccm einer 0,3%igen m-Nitrophenollösung enthielt. Da die Lösung im Indikatorröhrchen (X) und im Suspensionsgefäß (S) mit dem gleichen Kohlensäure-Sauerstoffgemisch durchströmt wurde, stellte sich auch in S die in X gemessene Wasserstoffionenkonzentration ein, jedoch etwas später. Dieses Nachhinken der Wasserstoffionenkonzentration in der Suspensionsflüssigkeit trat besonders dann in Erscheinung, wenn die Kohlensäure nicht stufenweise dem Sauerstoff zugesetzt wurde, sondern in der höchsten erreichbaren Konzentration zugeführt wurde. Um die Kohlensäure aus der Suspensionsflüssigkeit wieder möglichst rasch zu entfernen, wurde die Bikarbonatzufuhr durch Schließen der Klemme K_1 oder K_2 unterbrochen und reiner Sauerstoff aus der Bombe über die Zuleitung des Zweiweghahnes (D_2) in das Indikatorröhrchen und die Suspensionsflüssigkeit geleitet.

II. Versuche am Froschherzen.

Mit Hilfe der obenbeschriebenen Apparatur wurden an 50 überlebenden Froschherzen Versuche angestellt, deren Ergebnis kurz zusammengefaßt folgendes war:

Die *Kohlensäure* zeigte in hoher Konzentration in allen Versuchen eine negativ inotrope und negativ chronotrope Wirkung (W. STRAUB[7]). Bemerkenswert ist nur, daß der diastolische Stillstand bei $[H^+] = 5 \cdot 10^{-7}$ bis $[H^+]\ 1 \cdot 10^{-6}$ nicht bei allen Herzen gleichartig eintrat. Es wurde neben einer stetig abnehmenden Größe der Ventrikelkontraktionen auch ein schlagartiger Herzstillstand beobachtet, vor allem dann, wenn der Suspensionslösung *Kalzium* (0,5 ccm einer 10%igen $CaCl_2$-Lösung auf 50 ccm Suspensionslösung) zugefügt wurde. Dieser diastolische Stillstand war unter dem Einfluß dieser Kalziumkonzentration häufig von zahlreichen Ventrikelkonzentrationen kleineren Ausmaßes unterbrochen, die in unregelmäßigen Abständen einzeln oder gehäuft auftraten. Hier ist in erster Linie an die periodisch-rhythmische Tätigkeit des Herzens zu denken, die erstmalig von LUCIANI[8] beobachtet wurde, und deren Bedeutung bis heute noch nicht klargestellt wurde (vgl. hierzu v. SKRAMLIK[9] und LENDLE[10]). Die gruppenweise erfolgenden Schläge wurden auch häufiger als sonst in der Erholungsphase nach CO_2-Vergiftung beobachtet, wenn der Suspensionsflüssigkeit Kalzium zugefügt worden war.

Am ermüdeten Herzen konnte auch die erregende Wirkung geringer Kohlensäurekonzentration stets festgestellt werden, die seinerzeit Gegenstand zahlreicher Arbeiten gewesen ist (GÖTHLIN[11], CLARK[12], HAFFNER[13], MANSFELD[14], GRAMENICKIJ[15], AHLGREN[16], BAINBRIDGE[17], BARLOW[18]). Sie konnte außerdem dann beobachtet werden, wenn bei einem Herzen, welches infolge der hohen Wasserstoffionenkonzentration nur noch sehr schwach schlug, die Kohlensäurezufuhr plötzlich eingestellt wurde. Diese bereits von GALEOTTI und SIGNORELLI[19] beschriebene Erscheinung ließ sich aber keineswegs an allen Herzen reproduzieren.

Die Mehrzahl der Untersuchungen galt dem *Adrenalin*, welches bei einer Wasserstoffionenkonzentration von $1 \cdot 10^{-8}$ auf das überlebende Herz in allen angewandten Konzentrationen deutlich kontraktionsverstärkend wirkte. Bei einer Wasserstoffionenkonzentration zwischen $1 \cdot 10^{-6}$ und $5 \cdot 10^{-7}$ beeinflußte es den eingetretenen diastolischen Stillstand entweder überhaupt nicht oder rief nur geringe Kontraktionen des Ventrikels hervor.

---

[7] STRAUB: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **45**, 387 (1901). — [8] LUCIANI: Ber. Sächs. Akad. Wiss. **25**, 11 (1873). — [9] v. SKRAMLIK: Jena. Z. Med. **47**, 231 (1944). — [10] LENDLE: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **197**, 519 (1941). — [11] GÖTHLIN: Skand. Arch. Physiol. (D.) **7** (1901). — [12] CLARK: J. Physiol. (Brit.) **47**, 66 (1914). — [13] HAFFNER: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **139**, 100 (1929). — [14] MANSFELD: Ber. ges. Physiol. **22**, 260 (1923). — [15] GRAMENICKIJ: Ber. ges. Physiol. **65**, 111 (1931). — [16] AHLGREN: Skand. Arch. Physiol. (D.) **59**, 19 (1930). — [17] BAINBRIDGE: J. Physiol. (Brit.) **57**, 50 (1923). — [18] BARLOW: Amer. J. Physiol. **30**, 274 (1929). — [19] GALEOTTI u. SIGNORELLI: Rendic. c. R. Acad. dei Lincei Roma **18**, 643 (1910).

Das Ausbleiben der Adrenalinwirkung kann auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden, und zwar unter anderem darauf, daß bei der sauren Reaktion $[H^+] = 1 \cdot 10^{-6}$ bis $5 \cdot 10^{-7}$ die Adrenalinbase vollkommen in dissoziierter und dementsprechend in schlecht permeierbarer Form vorliegt. Als nächstes muß man aber auch daran denken, daß bei saurer Reaktion die Oxydation des Adrenalins nur schwer vonstatten geht und deshalb keine Wirkung eintritt, weil Adrenalin und ähnlich auch andere Dioxyphenole (z. B. Hydrochinon) nur in Sauerstoffgegenwart ihre Wirkung entfalten[20]. Eine Braunfärbung der Suspensionsflüssigkeit, die eine stattgefundene Oxydation des Adrenalins angezeigt hätte, wurde nicht beobachtet. Mit größter Wahrscheinlichkeit kann das Ausbleiben der Adrenalin-

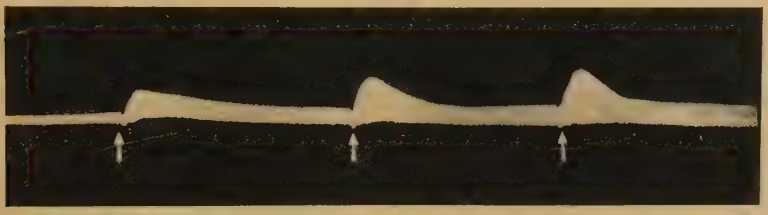


Abb. 2*. Versuch vom 5. 12. 43. Temporarienherz in 50 ccm RINGER-Lösung mit CO_2 bis zum diastolischen Stillstand behandelt. In der Erholungsphase je 1 ccm Adrenalin 1:10000 zugesetzt. 1. Pfeil 20^{40} Uhr $[H^+]$ zwischen $5 \cdot 10^{-8}$ und $2{,}5 \cdot 10^{-8}$; 2. Pfeil 21^{03} Uhr $[H^+] = 2{,}5 \cdot 10^{-8}$; 3. Pfeil 21^{30} Uhr $[H^+] = 1 \cdot 10^{-8}$.

wirkung aber auch auf eine Veränderung des Funktionszustandes des Herzmuskels zurückgeführt werden; der Herzmuskel hat bei entsprechend saurer Reaktion seine Fähigkeit, sich zu kontrahieren, verloren. Abb. 2 zeigt die Ventrikeltätigkeit und Adrenalinreaktion bei drei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen. Das Adrenalin führte jeweils zu einer Verstärkung der Ventrikelkontraktionen, die etwa doppelt so groß wurden wie die Herzkontraktionen, die vor dem Adrenalinzusatz bei entsprechender Wasserstoffionenkonzentration zur Beobachtung kamen. Ein Wirkungswandel des Adrenalins konnte aber weder durch Änderung der Wasserstoffionenkonzentration noch durch Variation der Adrenalindosis unter den beschriebenen Versuchsbedingungen erzielt werden.

Zusammenfassung.

Eine Methode zur Herstellung von Kohlensäure-Sauerstoff-Gasgemischen für die Untersuchung überlebender Organe in einer Kohlensäure-Bikarbonatpufferlösung wird beschrieben. Die einfache Apparatur ermöglicht eine rasche Variierung der Wasserstoffionenkonzentration in einem Bereich von $[H^+] = 1 \cdot 10^{-8}$ bis $[H^+] = 1 \cdot 10^{-6}$. Einige Froschherzversuche über die Wirkung von Kohlensäure, Adrenalin und Kalzium werden mitgeteilt.

[20] THER: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 41 (1947).

* Weitere Kurven können beim Verfasser eingesehen werden.

Laboratorium für Übermikroskopie der Siemens & Halske AG., Berlin-Spandau.

Über die Bindung des Sublimats an Bakterien und Virus*.

Von

Helmut Ruska.

Mit 9 Textabbildungen.

(Eingegangen am 21. Januar 1947.)

I. Ältere Versuche über die Bindung des Sublimats an Bakterien.

Bei der Einwirkung von Sublimat auf Bakterienzellen wird ein Teil des Sublimats bzw. Quecksilbers von den Zellen gebunden. Die dabei eintretende Aufhebung der Vermehrungsfähigkeit ist, wie wir seit Gegenbauer[1] wissen, in hohem Maße reversibel. So können z. B. im Anschluß an geeignete Behandlung vegetative Keime (Staphylokokken), die 72 Stunden einer 1%igen (!) Sublimatlösung ausgesetzt waren, noch lebensfähig sein oder Sporen (Milzbrand) nach über 30 Tagen (H. Engelhardt[2]). Das Sublimat tritt in Lösungsbeziehungen zum Bakterieneiweiß und zu den Lipoiden. Die Bindung, welche nach Gegenbauer wahrscheinlich am Eiweiß erfolgt, kann durch Schwefelwasserstoff bzw. Sulfide wieder gesprengt werden. Die Zellen erweisen sich danach zum Teil als lebend. Längeres Bestehen der Bindung soll das Absterben von Sporen bedingen, während das Absterben von vegetativen Keimen ein Effekt des im Protoplasma gelösten Sublimats sein soll[1]. Nach J. Schumacher[3], der den elementaren Vorgang der Metallwirkung in der Bildung von Metallsalzen der Nukleinsäure sah, müßte die Sublimatbindung im Zellinnern dort stattfinden, wo nach B. Stille[4], G. Piekarski[5], F. Neumann[6], G. Stapp[7] und nach eigenen lichtmikroskopischen Erfahrungen mit der Giemsa- und Feulgen-Färbung die Nukleinsäuren mikroskopisch nachzuweisen sind. K. Süpfle und A. Müller[8] vermuteten dagegen, daß die Quecksilberbindung in der Membran stattfindet. H. Engelhardt[2] nahm in ähnlicher Weise an, daß das Sublimat von den Hüllschichten der Bakterien adsorbiert wird. Tatsächlich ist es K. Süpfle[10] gelungen, an Milzbrandbakterien die Quecksilberbindung lichtmikroskopisch zu zeigen, und zwar fand er nach mehrstündiger Einwirkung von 1% Sublimat und nachträglicher Behandlung mit Schwefelwasserstoffwasser einzelne Zellen gequollen und bräunlich bis schwarz durch Schwefelquecksilber verfärbt. Den Nachweis, daß

* II. Mitteilung über den Einfluß keimschädigender oder keimabtötender Maßnahmen auf die Bakterienstruktur. I. Mitteilung (Temperatureinwirkungen) vgl. Z. Hyg. **123**, 294 (1941).

das Quecksilber in der Hüllschicht gebunden ist, führte er durch Behandlung mit Jodalkohol, wobei sowohl die Quellung als auch die Verfärbung verschwindet. Nach längerer Einwirkung von H_2S fand er außerdem feinste Körnchen im Bakterieninnern verteilt, die er als HgS-Ablagerungen betrachtete. Durch diese wichtigen Versuche wurde somit der Nachweis erbracht, daß das Quecksilber an verschiedene Zellen der gleichen Kulturaufschwemmung sehr ungleichartig und mitunter in solchen Mengen gebunden wird, daß sein lichtmikroskopischer Nachweis gelingt. Unklarheiten bestehen noch bezüglich des genaueren morphologischen und chemischen Orts und des Umfanges der Quecksilberbindung. Die erwähnten Veränderungen sind nur nach länger dauernder Einwirkung höherer Konzentrationen, sowie bei nachträglicher Behandlung der Bakterien mit Schwefelwasserstoff lichtmikroskopisch nachweisbar*.

Für die Erklärung der Wirkungsweise des Quecksilbers betonte W. Heubner[12] die Notwendigkeit, nicht die Wirkung der Metallionen (G. Joachimoglu[13]), sondern die Neigung des Quecksilbers zur Bildung von Komplexverbindungen in den Mittelpunkt zu stellen**. Von E. Hailer[14] wurde die gleiche Auffassung ausführlich begründet. Der verschiedene Dissoziationsgrad verschiedener Quecksilberverbindungen reicht ebensowenig aus, um die Unterschiede in der Wirkung verschiedener Quecksilberverbindungen zu deuten, wie die Verschiedenheit des Teilungskoeffizienten zwischen Lipoid und Wasser (Heubner). Wirksam ist nach Heubner das undissoziierte Molekül, aber welcher Komplex zur Wirkung führt, ist nicht bekannt. Fildes[15], der neuerdings mit Thiolazetat, Zystein und Glutathion entgiftete, nimmt bei der Vergiftung Reaktionen des Quecksilbers mit den Sulfhydrilgruppen am Bakterienweiweiß an. Bei der Entgiftung werden die für den Stoffwechsel der Bakterien notwendigen Sulfhydrilgruppen wieder frei gemacht. Jedenfalls hängt die Sublimatwirkung nicht einfach mit der eiweißfällenden Wirkung der Hg-Ionen zusammen, wie es auch in neueren Lehrbüchern mitunter noch dargestellt wird[16].

II. Elektronenmikroskopische Beobachtungen und ihre Deutung.

Im Folgenden wurde versucht, eine Anreicherung von Quecksilber an oder innerhalb der Bakterienzelle elektronenmikroskopisch sichtbar zu machen. Ferner wurde die Bindung an Bakterienzellen mit der Bindung an Virus-Elementarkörper verglichen. Falls eine der erwähnten Vorstellungen

* Durch Bakterien wird das Sublimat stärker gebunden als durch rote Blutkörperchen (L. Kalledey[19]). Nach neueren Untersuchungen von F. Jung[11] liegen bei der Bindung des Sublimats an Erythrozyten nicht ganz die gleichen Verhältnisse vor, wie die hier zu besprechenden.

** Der Verfasser ist Herrn Prof. Heubner für die Möglichkeit in eine noch nicht veröffentlichte Monographie über die Pharmakologie des Quecksilbers Einblick zu nehmen, ebenso wie für eine kritische Durchsicht dieser Arbeit zu ganz besonderem Dank verpflichtet. (Manuskripte dieser Mnoographie leider verloren! Heubner.)

über den Ort der Reaktion zu Recht besteht, mußten sich infolge der hohen spezifischen Dichte des Schwermetalls bei Aufnahme hinreichender Hg-Mengen entweder die Kernäquivalente (SCHUMACHER) oder die Membranen (SÜPFLE und MÜLLER, ENGELHARDT) durch Sublimat „anfärben" und selektiv darstellen lassen. Außerdem mußten sich Bakterien und Viren möglicherweise verschieden verhalten, weil die zum Vergleich herangezogenen Viren keine Membran besitzen (H. RUSKA[17]).

Die Untersuchungstechnik war die übliche[18]. Meist wurden die Objekte zusammen mit der in der Regel $1\,^0/_{00}$igen Sublimatlösung aufgetrocknet. Bei höheren Sublimatkonzentrationen wurden Bakterien durch zwei- bis dreimaliges Zentrifugieren in Aqua dest. oder nach dem Eintrocknen auf dem Trägerfilm gewaschen. Die Objekte können gegenüber der lichtoptischen Technik der Untersuchung ungefärbter, aufgetrockneter Präparate durch die Einwirkung des Vakuums und der Elektronenstrahlen Veränderungen erfahren. Das Vakuum wirkt stark austrocknend, tötet aber nicht ab, während die Elektronenstrahlen bei der für die hochauflösende Mikroskopie notwendigen Dosis abtöten (B. v. BORRIES[19]). Darüber hinaus werden die biologischen Substanzen bei der Bestrahlung denaturiert, verschwelen und verkohlen schließlich. Es gelingt deshalb nicht, Bakterien oder Virus elektronenmikroskopisch zu untersuchen und sie nach der ersten Betrachtung einer chemischen Einwirkung auszusetzen, bei der man noch mit dem ursprünglichen Zustand ihrer Substanz rechnen könnte. Das erschwert, zumal bei uneinheitlichem Ausgangsmaterial, wie es Bakterienpopulationen einer Kultur darstellen, die Beurteilung der Versuchsmaßnahmen erheblich, muß aber in Kauf genommen werden.

Bei Versuchen mit einige Stunden bis mehrere Tage alten Kulturen von Streptokokken, Koli- und Typhusbakterien, sowie nicht näher bestimmten Erdsporenbazillen, waren weder die Kernäquivalente noch die Zellmembranen ausschließlich „gefärbt". Vielmehr zeigte sich eine deutliche bis starke Kontrastzunahme des gesamten Zytoplasmas und eine geringe Zunahme im Kontrast der Membran. Darüber hinaus fanden sich in zahlreichen Zellen, die nur wenige Minuten einer $1\,^0/_{00}$ Sublimatlösung ausgesetzt waren, 20—80 mμ große, tiefschwarze, kugelige Gebilde in wechselnder Zahl. Diese scheinen bei manchen Zellen die Hauptmasse des gebundenen Sublimats auszumachen (vgl. Abb. 2—4). Auch in Konzentrationen von nur 0,0001 % Sublimat können sich *vereinzelte* Bakterien (besonders Streptokokken) noch in der beschriebenen Weise verändern. Neben der diffusen Schwärzung und den größeren Kugeln findet man mitunter allerfeinste Punktierungen des Zytoplasmas bis herunter zu etwa 5 mμ Durchmesser* (Abb. 3). Die größeren Kugeln liegen bevorzugt in den Außenzonen des Zytoplasmas unter der Membran, bei Zellen aus älteren Kulturen auch in dem zwischen Zytoplasma und Membran ausgebildeten Saftraum. Wahrscheinlich ist dies auf besondere chemische Verhältnisse in dieser Zone zurückzuführen. An unbehandelten Bakterien sind jedoch keine vorgebildeten Granulationen zu sehen, die man als besondere Reaktionsorte für

* Von ihrer Kleinheit erhält man eine Vorstellung, wenn man von einer 5 mμ großen Hg-Kugel das Gewicht und die Atomzahl ausrechnet, die $0{,}9 \times 10^{-12}\ \gamma$ bzw. 2650 Atome betragen.

die Quecksilberbindung auffassen könnte (Abb. 1). Es scheint sich um Ablagerungen zu handeln, die nicht an morphologisch präformierten Stellen stattfinden. Die Membranen selbst sind, wie erwähnt, an der Hg-Bindung nur im geringen Maße beteiligt. Es tritt keine Strukturierung auf, wie sie

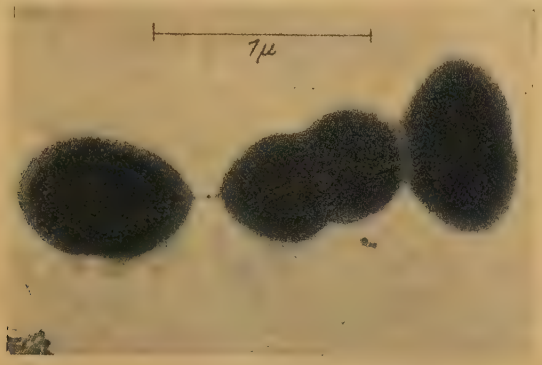


Abb. 1. 7737/41. Normale Streptokokken.

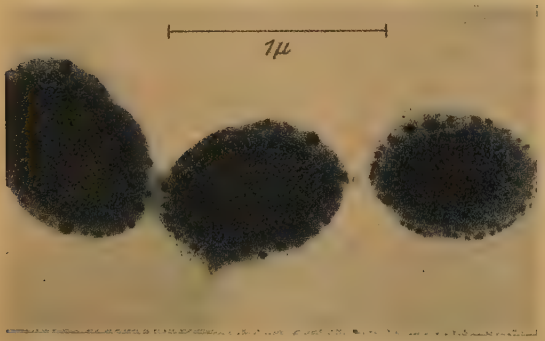


Abb. 2. 7734/41. Streptokokken nach einigen Minuten Einwirkung von 1‰ Sublimat.

an den Membranen der roten Blutkörperchen beobachtet wurde[11]. Möglicherweise findet dieser Unterschied seine Erklärung darin, daß die Bakterienmembranen nicht aus Eiweißsubstanzen und Lipoiden, sondern aus Hemizellulosen und Pektinen bestehen. Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen amerikanischer Autoren (St. Mudd und Th. F. Anderson[20]) lassen Sublimat, Silbernitrat und Bleiazetat die Zellmembran ungefärbt. Zweifellos ist die Dichtezunahme der Membran bei Sublimatbehandlung wegen ihrer Geringfügigkeit gegenüber der Dichtezunahme des Zytoplasmas übersehen worden*.

Die Quecksilberbindung erfolgt nach der elektronenmikroskopischen Untersuchung in wenigen Minuten und bewirkt innerhalb dieser und

* *Anmerkung bei der Korrektur:* Vergl. auch die Beobachtungen von K. Gärtner, Z. Hyg. 125, 86 (1943).

sehr viel längerer Zeiten, wie erwähnt, keine irreversible Schädigung aller Zellen. Längere Einwirkung von Sublimat vermehrt die nachweisbare Bindung nicht wesentlich. Bemerkenswerterweise verhalten sich, worauf schon SÜPFLE bei seinen lichtmikroskopischen Untersuchungen aufmerksam machte, nicht alle Zellen einer Bakterienpopulation gleich. Die Unterschiede sind oft sehr erheblich. Manche

Abb. 3. 7570/41. Kolibakterien nach einigen Minuten Einwirkung von 0,01‰ Sublimat.

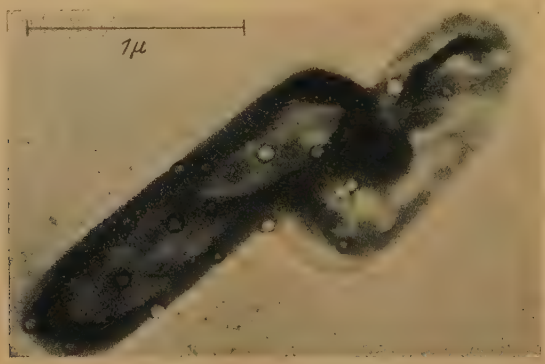


Abb. 4. 7571/41. Wie Abb. 3 nach starker Elektronenbestrahlung.

Zellen nehmen eine große, andere kaum nachweisbare Quecksilbermengen auf und außerdem überwiegen einmal grobe, dann wieder sehr feine Quecksilberanhäufungen oder die Quecksilberanlagerung beschränkt sich auf eine homogene Schwärzung des Zytoplasmas. Von MUDD und ANDERSON[20] ist offenbar ausschließlich letztere beobachtet worden. Möglicherweise hängt die ungleiche Quecksilberaufnahme mit einem durch das verschiedene Alter der Zellen bedingten unterschiedlichen Reaktionsvermögen zusammen. Die Verschiedenheiten bestehen auch dann noch, wenn man mehr Sublimat zusetzt als von den Zellen gebunden werden kann. Diffuse Zytoplasmaschwärzung und punktförmige

Hg-Ablagerung bzw. -Bindung erfolgen in gleicher Weise, wenn die Bakterien durch Erwärmen auf 56 oder 100° abgetötet sind. Dies entspricht der seit langem bekannten Bindung des Sublimats durch hitzegeronnenes Eiweiß oder gekochte Hefezellen[14]. Läßt man die Sublimatlösungen auf Zellen einwirken, die einige Minuten in Osmiumdampf fixiert wurden, so findet man auch darin noch punktförmige Ablagerungen von Hg. Eine diffuse Schwärzung von Zytoplasma und Membran läßt sich dagegen nicht mehr sicher auf das Sublimat allein zurückführen, da diese schon ausschließlich durch das Osmium hervorgerufen sein kann.

Nach kurzem Waschen der Bakterien in 1%iger Kochsalzlösung und in destilliertem Wasser sowie nach kurzem Aufkochen finden sich in den aufgetrockneten Zellen immer noch Ablagerungen der beschriebenen Art. Erst nach 8—12stündigem Stehen in Wasser scheinen die kugeligen Verdichtungen nicht mehr in der ursprünglichen Häufigkeit zur Darstellung zu kommen. Da im Zellsaft gelöstes (und für die Beobachtung im Vakuum eingetrocknetes) Sublimat sich leicht herauswaschen müßte, kann es sich bei den beobachteten Schwärzungen nicht um unverändertes Sublimat handeln. Vielmehr muß eine in Wasser schwerlösliche, wahrscheinlich organische Quecksilberverbindung vorliegen. Eine langsame Ausscheidung des aufgenommenen Quecksilbers erscheint aber auch dann nicht unmöglich, wenn es sich in metallischer Form in der Zelle befindet. Zu ähnlichen Ablagerungen wie Sublimatzusatz kann Zusatz von Quecksilberazetat-, -oxyzyanat und -nitratoxydul führen. Andere Schwermetallsalze ($CuCl_2$, $AgNO_3$) rufen eine diffuse Schwärzung des Zytoplasmas, aber nicht die beschriebenen kugeligen Ablagerungen hervor.

Bei stärkerer Bestrahlung mit Elektronen können die Kugeln und die Punkte leicht zur Sublimation gebracht bzw. zerstört werden (Abb. 3 und 4). Die diffuse Schwärzung des Zytoplasmas bleibt dagegen auch bei starker Bestrahlung erhalten. Bei der Bindung des Sublimats an rote Blutkörperchen läßt sich nach Jung[11] durch Bestrahlung mit Elektronen eine Sublimation ebenfalls nicht nachweisen. Nach dem unterschiedlichen Verhalten der kugelförmigen Ablagerungen und der diffusen Zytoplasmaschwärzung muß man annehmen, daß die Hg-Aufnahme bei den Bakterien in verschiedener Form erfolgt ist und daß die Kugeln wahrscheinlich aus metallischem Quecksilber bestehen.

In Erweiterung der Befunde von Süpfle läßt sich die Sublimatbindung bei Konzentrationen von über 1—0,0001% nach kürzester Einwirkungszeit und ohne Nachbehandlung mit Schwefelwasserstoff als geringfügige Kontrastzunahme der Zellmembran, als diffuse Schwärzung des Zytoplasmas, und in einer wechselnden Zahl von Bakterien in Form kugeliger Ablagerungen unter der Membran nachweisen.

Unterwirft man Virus der Einwirkung von Sublimat, so kommt man zu Befunden, die dadurch von jenen bei den Bakterien abweichen, daß die diffuse Schwärzung zurücktritt bzw. fehlt und daß die punktförmigen Ablagerungen auf der Virusoberfläche liegen. Verwendet wurde das Virus des Molluscum contagiosum (Abb. 5), weil dieses leicht in einem für die Übermikroskopie ausreichendem Reinheitszustand zu gewinnen ist. Ein aus der Reaktion zwischen dem Eiweiß der Elementarkörper und dem Sublimat entstehendes Produkt, wiederum möglicherweise metallisches Hg, ist in Form von Körnchen großer Gleichmäßigkeit (etwa 10—20 mμ Durchmesser) auf der Oberfläche der Elementarkörper adsorbiert (Abb. 6). Die Körnchen liegen nicht wie bei den Bakterien unter einer Membran und lösen sich daher leicht ab. Sie sind ebenso wie jene in den Bakterien durch starke Elektronenbestrahlung zu zerstören (Abb. 7). Gemeinsam mit G. A. KAUSCHE wurden entsprechende Befunde auch am Tabakmosaikvirus erhoben (Abb. 8).

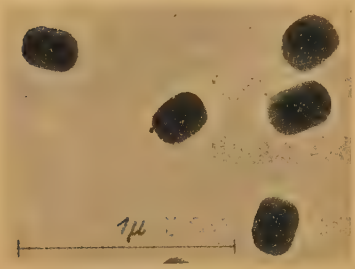


Abb. 5. 9492/41. Virus des Molluscum contagiosum.

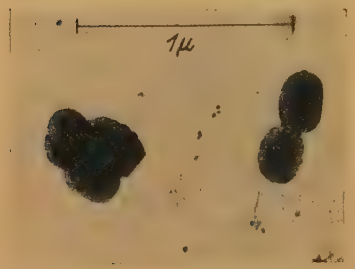


Abb. 6. 9027/41. Virus des Molluscum contagiosum nach 1‰ Sublimat.

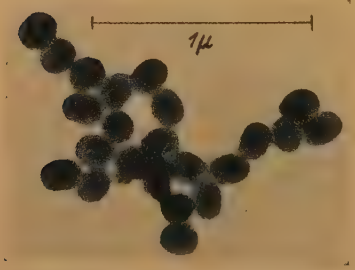


Abb. 7. 9156/41. Wie Abb. 6; nach Kochen der Elementarkörper und nach starker Elektronenbestrahlung. Schrumpfung des Virus und Sublimation der Quecksilberablagerung (helle Punkte).

III. Sichtbare Quecksilberbindung und Absterbemechanismus.

Bei der Deutung der Ergebnisse ergibt sich die Frage, ob wir durch die sichtbare gemachte Quecksilberbindung nur über diese etwas erfahren oder auch über die spezielle, zum Zelltod bzw. zur Inaktivierung des Virus führende Reaktion. Es wäre denkbar, daß durch das Sublimat bestimmte, für die Funktion der Zelle unerläßliche Stoffe, blockiert werden (Sulfhydrilgruppen[15]) und daß dadurch zunächst eine reversible Schädigung eintritt, die nach längerem Bestehen irreversibel wird. Die verschiedenen Formen der sichtbaren Hg-Anlagerung scheinen für die Abtötung nicht wesentlich zu sein, weil sichtbare Veränderungen nicht in allen Zellen von Kulturen auftreten, die durch Sublimat in ihrer Entwicklung gehemmt sind. Die Annahme, daß es sich bei diesen Zellen, die keine derartige

Hg-Bindung zeigen, um Individuen handeln könnte, die ohnehin schon abgestorben sind, und daß diese deshalb kein Quecksilber mehr aufgenommen haben, erscheint wenig wahrscheinlich, weil durch Erhitzen oder Osmiumtetroxyd abgetötete Zellen noch Quecksilber zu binden vermögen.

Wenn es zutrifft, daß wir es bei den Absterbekurven der Bakterien die nach einer Exponentialfunktion verlaufen, und speziell bei der hierzu gehörenden Sublimatvergiftung mit der Auswirkung einer monomolekularen Reaktion (Madsen und Nymann[21], Chick[22], Jordan[23]) zwischen dem Giftmolekül und einem Akzeptor der Bakterienzelle (Schubert[24]) zu tun haben, so dürfen wir nicht erwarten, das Ergebnis dieser Reaktion zu sehen. Wir können zwar Ablagerungen einiger 1000 Hg Atome, nicht aber die Bindung eines einzelnen Sublimatmoleküls erkennen, das im Sinne einer „Eintreffer-Tötung" (Jordan) die Giftwirkung herbeigeführt hat. Abweichungen vom Kurvenverlauf der monomolekularen Reaktion deutet Schubert[24] als Folge von Hemmungsreaktionen, die nicht am „Akzeptor", sondern am Bakterienleib, dem „Soma", angreifen sollen.

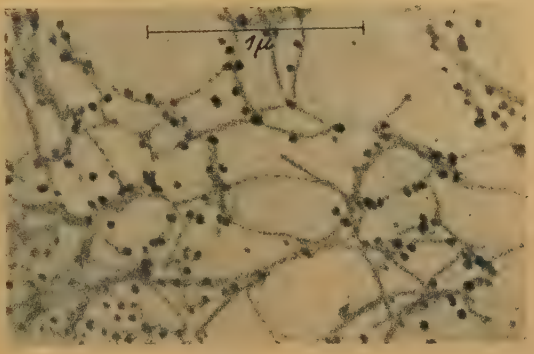


Abb. 8. 9159/41. Tabakmosaikvirus mit 1‰ Sublimat.

Reichenbach[25] hat die Absterbekurve indessen anders gedeutet. Nach seinen Ausführungen erfolgt das Absterben der Keime nicht deshalb nach einer Exponentialfunktion, weil eine monomolekulare Reaktion dem Absterbemechanismus zugrunde liegt, sondern weil der Aufbau der Bakterienkolonie nach einer Exponentialfunktion erfolgt, aus der eine entsprechende Resistenz der einzelnen Zellen resultiert. Reichenbachs Auffassung wird zwar heute abgelehnt[24], kann aber nicht als endgültig widerlegt gelten. Morphologische Beobachtungen an physikalisch durch Temperatureinwirkung[26] und besonders durch hochfrequenten Schall (Abb. 9) geschädigten Bakterien, deren Absterbekurven ebenfalls nach einer Exponentialfunktion verlaufen[27], zeigen mechanische Verletzungen, die nicht als Auswirkungen monomolekulare Reaktionen angesehen werden können, aber höchstwahrscheinlich die Ursache des Absterbens der Zellen sind. Bei beschallten Bakterienzellen (Abb. 9) beobachtet man z. B. häufig ein Zerreißen oder völliges Abschälen der Zellmembran, so daß hier eine Schädigung des vegetativen Teils der Zelle — also des Somas im Sinne Schuberts, — als Ursache des Absterbens (nicht nur einer Hemmung) betrachtet werden muß. Es ist nicht notwendig, hierbei eine

Schallschädigung des als Molekül gedachten Akzeptors oder des Kernäquivalents anzunehmen, und es wäre wertvoll, wenn die Absterbekurven bei der Ultraschallbehandlung und deren Deutung durch genaue morphologische Untersuchungen ergänzt würden. Bei der Sublimatvergiftung liegt jedoch keine einheitliche Veränderung des vegetativen Teils der Zellen vor, die sich mit Sicherheit zur Entwicklungshemmung in Beziehung setzen läßt. Die *sichtbare* Quecksilberbindung bzw. Ablagerung ist, nach ihrem uneinheitlichen Ausfall beurteilt, für die Entwicklungshemmung nicht entscheidend. Sie kann auch, wie betont wurde, an bereits in anderer Weise abgetöteten Zellen noch erfolgen. Die Unsichtbarkeit einer in allen Zellen einheitlich ausfallenden und zur Entwicklungshemmung in Beziehung zu setzenden Reaktion spricht vielmehr hier für die Bedeutung elektronenmikroskopisch nicht sichtbarer molekularer Vorgänge.

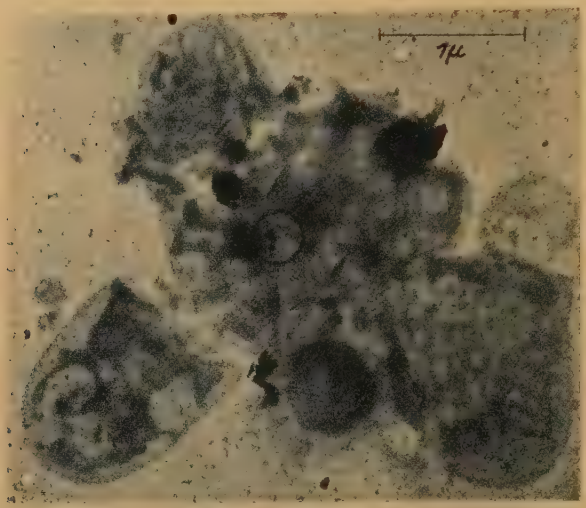


Abb. 9. 1911/41. Zellreste (Membranen) von Bakterien, die durch hochfrequenten Schall (magnetostriktiv 7,5 kHz, 5 Min.) abgetötet wurden.

Die Bilder zeigen nicht alle Feinheiten, da die Originalaufnahmen aus dem Jahre 1941 vernichtet sind und die Klischees nach alten Reinandrucken aus dem Jahre 1944 neu geätzt werden mußten.

Zusammenfassung.

Die elektronenmikroskopisch sichtbare Bindung des Sublimats an Bakterien erfolgt an drei morphologisch verschiedenen Orten der Zelle: 1. in Spuren an der Zellmembran, 2. in stärkerem Maße diffus am Zytoplasma und 3. mit verschiedener Häufigkeit in Form kugeliger Ablagerungen von 5—80 mμ Durchmesser im Spaltraum zwischen Membran und Zytoplasma.

An den Kernäquivalenten wird das Quecksilber nicht sichtbar angereichert.

Bei der Behandlung von Virus mit Sublimat finden sich Ablagerungen an der Virusoberfläche adsorbiert, die den bei Bakterien unter drei beschriebenen Befunden entsprechen.

Chemisch ist das Quecksilber in mindestens zwei verschiedenen Formen vorhanden, von denen sich eine durch stärkere Elektronenbestrahlung

leicht zur Sublimation bringen läßt[3]. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um metallisches Quecksilber.

Die Bedeutung morphologischer Beobachtungen für den Mechanismus des Absterbevorganges wird besprochen.

Literatur.

[1] Gegenbauer, V.: Arch. Hyg. (D.) **90**, 23 (1921). — [2] Engelhardt, H.: Desinfektion **7**, 2. Hälfte, 63, 81 (1922). — [3] Schumacher, J.: Biochem. Z. **134**, 389 (1923). — [4] Stille, B.: Arch. Mikrobiol. 8, 125 (1937). — [5] Piekarski, G.: Arch. Mikrobiol. 8, 428 (1937). — [6] Neumann, F.: Zbl. Bakter. usw. **103**, 385 (1941). — [7] Stapp, C.: Zbl. Bakter. usw. II **105**, 1 (1942). — [8] Süpfle, K. u. A. Müller: Arch. Hyg. (D.) **89**, 351 (1920). — [9] Süpfle, K.: Arch. Hyg. (D.) **93**, 250 (1923). [10] Kalledey, L.: Virchows Arch. **213**, 395 (1913). — [11] Jung, F.: Arch. exper. Path. (D.) **204**, 139 (1947). — [12] Heubner, W.: Biochem. Z. **143**, 431 (1924). — [13] Joachimoglu, G.: Med. Klin. **20**, 14 (1924). — [14] Hailer, E.: In Weyls Handbuch der Hygiene, Bd. 8, S. 861, 2. Aufl. 1925. — [15] Fildes, F.: Brit. J. exper. Path. **21**, 67 (1940). — [16] Leipert, u. J. Matula: Lehrbuch der anorganischen Chemie. Wien: Franz Deuticke 1943. — [17] Ruska, H.: Dtsch. med. Wschr. **1941**, 281. — Arch. Virusforsch. **2**, 480 (1943). — [18] Ruska, H.: Naturw. **27**, 287 (1939). — [19] Borries, B. v.: Optik 1947 (im Druck). — [20] Mudd, St. and Th. F. Anderson: J. exper. Med. (Am.) **76**, 103 (1942). — [21] Madsen, Th. u. M. Nymann: Z. Hyg. **57**, 389 (1907). — [22] Chick: J. Hyg. (Brit.) 8, 92, 654 (1908); **10**, 237 (1910). — [23] Jordan, P.: Radiologica **2**, 16, 166 (1938). — Arch. Virusforsch. **1**, 1 (1939). — [24] Schubert, H.: Zbl. Bakter. usw. Orig. **150**, 66 (1943). — [25] Reichenbach, H.: Z. Hyg. **69**, 171 (1911). — Zbl. Bakter. usw. I **47**, 75 (1910). — [26] Siehe Fußnote zu Beginn der Arbeit. — [27] Zit. nach P. Jordan: Physis (Arg.) **1**, 64 (1942).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. med. L. Heilmeyer).

Über Beeinflussung des Muskelinnendruckes beim Menschen.

Von

Joachim Frey*.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 14. Februar 1947.)

Die Bedeutung des Muskelinnendruckes (M.I.D.) für den venösen Blutrückfluß zum Herzen und damit für die Fördergröße desselben ist erst in letzter Zeit ausreichend erkannt worden.

Für die venöse Strombahn gelten zum Teil andere Voraussetzungen für die Vorwärtstreibung und das Fassungsvermögen des Blutes als für die arterielle. Während bei letzter das Druckgefälle, die elastischen Wandverhältnisse und die aktiven Weitenumstellungen für den Blutdurchfluß ausschlaggebend sind, rückt für die Blutrückflußbahn zum Herzen die außerordentlich variable Blutkapazität in den Vordergrund. Neben anderen Hilfsmechanismen, die wir früher auseinandergesetzt und besprochen haben (Frey[3], S. 389/390) wie Übertragung der pulsatorischen Kaliberschwankungen von Arterie auf Vene (Schade und Mitarb.[1]) usw. ist es der Spannungsgrad der Skelettmuskulatur (Tonus), der einen großen Einfluß auf Füllung und Druck der in sie eingebetteten Venen hat, in dem Sinne, daß bei M.I.D.-Steigerungen ein Ausdrücken des Blutes herzwärts und eine Venendrucksteigerung eintritt. „Ein guter Muskeltonus verhindert die abnorme Erweiterung der Kapillaren, der kleinen und großen Venen der tiefgelegenen Körperteile unter Wirkung des hämostatischen Druckes und erleichtert den Blutrückfluß zum Herzen" (Mateeff[2]). Entgegen früherer Meinung, die als Ort des hämostatischen Blutversackens das Splanchnikusgebiet bezeichnete, sind diese Blutverschiebungen vor allem in die unteren Gliedmaßen zu lokalisieren (Frey[3]). Durch Bandagieren der Beine lassen sie sich aufheben (Mateeff und Mitarb.[2], Frey[3]), durch Wärme (Frey) und Hypoxämie (Schwarz[4], Frey und Holtz[5]) verstärken.

Die Beeinflussung des M.I.D. durch die Temperatur hat Henderson[6] untersucht, der dem allgemeinen Tonus eine Funktion von höchster Wichtigkeit zuschreibt. Vor allem aber sah er den Spannungsgrad der Atemmuskulatur abhängig von der Kohlensäurespannung des Blutes und schrieb die postoperative schlechte Lungenventilation einer allgemeinen Herabsetzung des Muskeltonus zu, wie er gleichfalls die für den Kreislauf so verhängnisvolle Abrauchung der Kohlensäure durch vertiefte und beschleunigte Atmung in der Narkose bei lange dauerndem Erregungsstadium betonte. Beiglböck und Junk[7], sowie Budelmann[8] prüften das Verhalten des M.I.D. bei verschiedenen Erkrankungen in den einzelnen Altersstufen, bei Einwirkung einer Reihe von Pharmaka u. a. m. Eine Herabsetzung des M.I.D. fand sich bei akuten und chronischen Erkrankungen, besonders bei Pneumonien und Pleuraempyemen, im Kollaps, in tiefer Narkose, wobei

* Nach gemeinsamen Arbeiten mit Frl. cand. med. Suse Becker.

die niedrigsten Werte ermittelt wurden, nach Operationen, bei Herzvitien mit Herzinsuffizienz, nach Aderlaß und bei Extremitätenstauung (arteriell), bei Anämie und malignen Tumoren, bei Bettruhe, im Alter und bei Moribunden. Strychnin und Sympatol steigerten den M.I.D., während Cardiazol, Coramin, Lobelin, Icoral, Koffein und Hexeton ihn unbeeinflußt lassen. Über die Wirkung von CO_2-Einatmung gehen die Meinungen der letztgenannten Autoren auseinander.

Im Verlauf von andersartigen Kreislaufuntersuchungen über die Kapillardurchblutung (Frey und Holtz[5]) und über den Zeitbedarf der Blutströmung innerhalb der zahlreichen Teilkreisläufe (Frey und Zimmermann [noch unveröffentlicht]) wurde unsere Aufmerksamkeit wiederum auf die Bedeutung des M.I.D. für den venösen Blutrückstrom gelenkt, insbesondere erschien uns wichtig zu untersuchen, wie sich *Änderungen der Blutgase auf den M.I.D. auswirken*, da damit zwangsläufig auch Kreislaufumstellungen verbunden sind.

Zur Bestimmung des M.I.D. wurde das Verfahren von Beiglböck und Junk[7] angewandt, mit dem derjenige Druck ermittelt wird, bei dem eine physiologische Kochsalzlösung durch eine in den völlig entspannten Musc. biceps brachii eingestoßener Hohlnadel eben gerade einzufließen beginnt. Vor den 127 ausgeführten Versuchen wurde eine $^1/_4$—$^1/_2$stündige Körperruhe eingehalten; Gesunde (Studenten von 18—26 Jahren) und Kranke der Klinik (im Alter von 18—62 Jahren, jedoch kreislauf- und nervensystemgesund) dienten als Vp.

Um festzustellen, ob der M.I.D. Schwankungen unterworfen ist, die die Untersuchungsergebnisse beeinflussen könnten, wurde er über $^1/_2$ Stunde (übliche Versuchsdauer) in zahlreichen Einzelbestimmungen an mehreren Vp. gemessen. Er kann über die genannte Zeit als konstant angesehen werden, die Schwankungen sind sehr gering und betragen maximal $\pm$ 3 mm H_2O. Die absolute Größe des normalen M.I.D. liegt nach unseren Erfahrungen beim Gesunden zwischen *50* und *90*, im Mittel bei 75 mm H_2O. Das ist niedriger als die von Beiglböck und Junk und die von Budelmann ermittelten Werte. Die Versuche wurden von Januar bis Mai 1942 ausgeführt; ob jahreszeitliche Schwankungen mit einem Minimum im Frühjahr möglicherweise bestehen, wurde nicht untersucht.

Zur Prüfung der Beeinflussung des M.I.D. durch die Blutgase wurde *eine Erhöhung der CO_2-Spannung im Blut* durch Atmung von kohlensäureangereicherten Luftgemischen und durch Muskelarbeit vorgenommen.

a) Atmung von CO_2-Luftgemischen.

Die Vp. atmete CO_2-Luftgemische, die vor dem Versuch hergestellt wurden, aus einem Douglas-Sack über eine Gasuhr ein. Dabei wurden Zahl der Atemzüge und das Atemvolumen/Zeit neben dem Blutdruck bestimmt. Die CO_2-Gemische enthielten, sofort nach dem Versuch nach Haldane bestimmt, 3—6% CO_2.

Falls vor dem Versuch eine Körperruhe von $^1/_2$ Stunde eingehalten wurde, fanden wir jedesmal eine Steigerung des M.I.D. mit einem Maximum nach 4—10 Min. CO_2-Atmung. Die Unterschiede zwischen Ausgangs- und Höchstwert schwankten zwischen 11 und 33 mm H_2O (im Durchschnitt betrugen sie 14 mm H_2O). Der Blutdruck erhöhte

sich natürlich; sein Höchstwert wurde aber nicht immer zur gleichen Zeit mit dem des M.I.D. erreicht. Die Reizung des Atemzentrums fand ihren Ausdruck in der Erhöhung des Atemminutenvolumens, während die Atemfrequenz nur gering anstieg. Die Abb. 1 zeigt als Beispiele 2 Versuche, aus denen ersichtlich ist, daß der Höchstwert des M.I.D. noch während der CO_2-Atmung erreicht ist und daß hier der Abfall

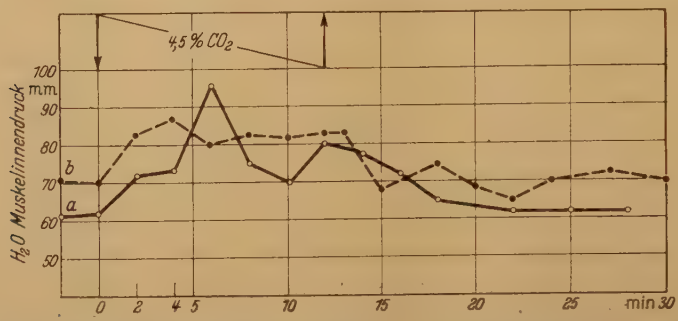


Abb. 1. a Vers.-Nr. 6. S., 23 Jahre, ♀, 7. 5. 42; b Vers.-Nr. 4. H., 18 Jahre, ♂, 4. 5. 42. Erhöhung des Muskelinnendruckes im Biceps brachii bei Einatmung eines Gemisches von Luft + 4,5 % CO_2 (zwischen den Pfeilen).

während noch bestehender CO_2-Atmung oder nach Absetzen derselben von einem erneuten Anstieg unterbrochen wurde, wie es bei fast allen Versuchen der Fall war.

Bei 6 Versuchen, die nicht unter Ruhebedingungen ausgeführt wurden, verursachte die CO_2-Atmung keine verwendbare Steigerung des M.I.D.

b) Muskelarbeit.

Sie führt zu einer Vermehrung der Kohlensäure und von fixen Säuren, besonders von Milchsäure. Außerdem wird die Erregbarkeit des Atemzentrums (NIELSEN [9]) und die des Vasomotorenzentrums (REIN und Mitarb.[10]) für den adäquaten Reiz Kohlensäure gesteigert. Bei Muskelarbeit wird also der gesteigerte Kohlensäurereiz von den Zentren mit einem noch größeren Effekt beantwortet.

Zur Ableistung einer meßbaren Muskelarbeit verwandten wir das JAHNsche Ergometer (A. Dargatz, Hamburg), das eine Berechnung der Arbeit in mkg/Sek. gestattet. Der Vorteil dieses Ergometers besteht in seiner Verwendung für Tretarbeit liegender Vp. Dies ist für die M.I.D.-Messungen von Wichtigkeit, da die gesamte Körpermuskulatur unter gleichen Bedingungen — nämlich in vollkommener Entspannung — stehen soll. Nach Ermittlung von M.I.D. und Blutdruck wurde 5 Min. lang Arbeit geleistet (14—21 mkg/Sek.) — Messungen waren während der Arbeit wegen der Unruhe der Vp. nicht möglich — und sofort nach Ende der Muskelarbeit wurde mit den Bestimmungen des M.I.D. begonnen.

Wir fanden eine starke Erhöhung des M.I.D., gemessen im Musc. biceps brachii, der nicht an der Arbeit teilgenommen hatte, die im weiteren Verlauf innerhalb von 5—8 Min. zum Ausgangswert, teilweise

auch zunächst darunter, zurückkehrte (Abb. 2). Das Verhalten des Blutdruckes zeigte das übliche Bild mit Anstieg des systolischen und Abfall des diastolischen Druckes, Veränderungen, die innerhalb der gleichen Zeit wie der M.I.D. zum Ruhewert sich rückbildeten. Die Steigerung des M.I.D. lag zwischen 7 und 50 mm H_2O, sie erstreckte sich — wie gesagt — auf die ruhende Muskulatur einer oberen Extremität.

Eine *Herabsetzung der Kohlensäurespannung des Blutes* wurde durch aktive und passive Hyperventilation erreicht.

a) Aktive Hyperventilation.

Durch willkürliche Mehratmung über eine Zeit von 8 bis 12 Min. wurde eine Hypokapnie erreicht, die bis zu den Vorzeichen der Hyperventilationstetanie getrieben wurde. Kam es, wie in einzelnen Fällen, zu krampfartigen Muskelzuckungen, so wurde die Mehratmung abgebrochen, da dadurch der M.I.D. sofort zum Anstieg gebracht wurde.

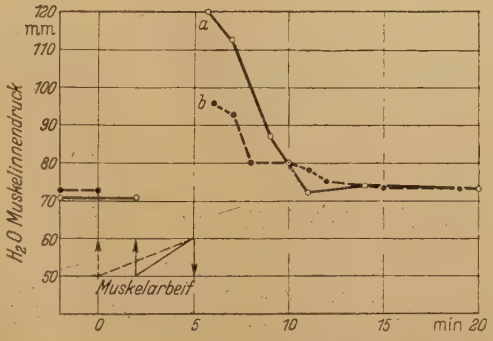


Abb. 2. *a* Vers.-Nr. 4. Z., ♂, 25 Jahre. 14. 5. 42; *b* Vers.-Nr. 6. W., ♂, 25 Jahre 15. 5. 42. Steigerung des Muskelinnendruckes (gemessen im ruhenden Musc. biceps brachii) durch Muskelarbeit (Tretarbeit der Beine) von 3 Min. (Kurve *a*) und 5 Min. Dauer (Kurve *b*).

Bei jeder Versuchsperson erzielten wir durch die Hyperventilation ein deutliches Absinken des M.I.D. Der Unterschied zwischen Ausgangs- und Mindestwerten, welche 6—10 Min. nach Beginn der Atmungssteigerung erreicht wurden, schwankte zwischen 7 und 20 mm H_2O; auch der Blutdruck war einer Senkung unterworfen. Während der nachfolgenden Apnoe, bei der es zu einer sehr deutlich ausgeprägten Zyanose innerhalb kurzer Zeit kam, stieg der M.I.D. über den Ausgangswert an, um dann mit Ingangkommen der Atmung unter 1—2 Schwankungen auf die Höhe sich einzustellen, die er vor dem Versuch einnahm.

b) Passive Hyperventilation.

Die Möglichkeit der Mitanspannung des Musc. biceps brachii und damit einer fehlerhaften Beeinflussung der Messungen während der Hyperventilation konnte durch Anwendung des Biomotors (Lautenschläger, München) ausgeschaltet werden. Weitere Vorteile des Apparates liegen in der Regulierbarkeit der Aus- und Einatmungsstärke und der Atemfrequenz bei fehlender Anstrengung der Vp.

Wie die Abb. 3 zeigt, hat die passive Hyperventilation ebenfalls eine Herabsetzung des M.I.D. (und des Blutdruckes) zur Folge, aber erst nach einer viel längeren Zeit im Vergleich zur aktiven Hyperventilation. Der Grund für den Zeitunterschied bis zum Absinken des M.I.D. liegt in der

geringeren Hyperventilationsstärke durch den Biomotor, der Druck und Sog vor allem auf den Bauch ausübt.

Ferner wurde der Einfluß von *Änderungen der Blutsauerstoffspannung* auf den M.I.D. untersucht. Bei Atmung von reinem O_2 war bei keiner der gesunden Versuchsperson eine Änderung festzustellen, während Verminderung der O_2-Spannung im Blut (Hypoxämie) einen M.I.D.-Anstieg hervorruft (FREY und KÜCHLE[12]).

Das *Veritol* (Fa. Knoll A.-G., Ludwigshafen), das sich zur Beseitigung von orthotischen Blutverschiebungen in die unteren Extremitäten bewährt hatte (FREY[3]) und nach REIN[11] — am Hunde — besonders die venöse Kreislaufseite tonisiert, wurde ebenfalls einer Prüfung unterzogen, da seine gute Wirksamkeit auch auf einer Steigerung des M.I.D. beruhen konnte. Und in der Tat ließ sich

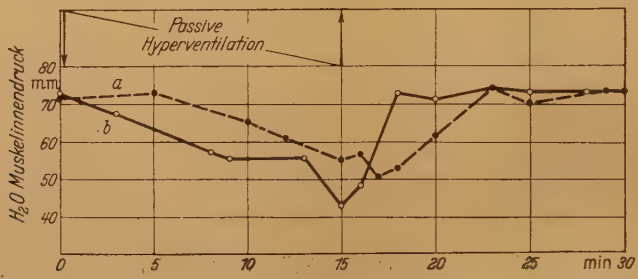


Abb. 3. *a* Vers.-Nr. 6. Z., ♂, 25 Jahre. 14. 5. 42; *b* Vers.-Nr. 7. W., ♂, 25 Jahre, 15. 5. 42. Senkung des Muskelinnendruckes durch Kohlensäureabrauchung mittels passiver Hyperventilation (Biomotoratmung).

in jedem Fall eine Erhöhung des M.I.D. durch subkutane Injektion von 0,02 bzw. 0,04 g Veritol nachweisen (Abb. 4). Der Höhepunkt der Wirkung trat bei dieser Applikationsart 8—10 Min. nach der Gabe ein und lag 15—45 mm H_2O über dem Ausgangswert (im Mittel bei + 24 mm H_2O). Nach etwa $^1/_2$ Stunde ist der Ausgangswert wieder erreicht, was auch mit der Wirkungszeit des Veritols auf den Venendruck (GROSSE-BROCKHOFF und MOLINEUS[12] und eigene Untersuchungen) übereinstimmt. Die Größe des Maximalwertes hängt jedoch nicht von der Größe der Veritolgabe ab, außerdem war bei den hier angewandten Dosen eine Blutdrucksteigerung nicht nachweisbar. — Andere Kreislaufmittel, wie Suprifen, Tonhormon, Veriazol und Pervitin hatten ebenfalls eine M.I.D.-Steigerung zur Folge, jedoch wurde sie vom Veritol deutlich übertroffen. Hieraus ist ersichtlich, daß die starke Rückflußförderung des Blutes durch das Veritol auch von einer Steigerung des M.I.D. bewerkstelligt wird.

Wir sehen also, daß mit Änderungen der Blutgase auch Änderungen des M.I.D. verbunden sind. Und zwar führt Hypokapnie zu einer Herabsetzung, Hyperkapnie zu einer Steigerung des M.I.D. Während O_2-Atmung den M.I.D. unbeeinflußt läßt, wird eine Hypoxämie mit einer Steigerung desselben beantwortet, wie in früheren Versuchen durch Luftdruckherabsetzung (FREY und KÜCHLE[13]) und in den jetzigen während des Atemstillstandes nach Hyperventilation (kenntlich an einer starken Zyanose) gefunden wurde.

Über die verschieden beantwortete Frage, nach welcher Richtung CO_2-Atmung den M.I.D. beeinflusse, können wir uns also in Übereinstimmung mit HENDERSON, sowie BEIGLBÖCK und JUNK und in Widerspruch zu BUDELMANN dahingehend äußern, daß Hyperkapnie zu einer M.I.D.-Steigerung führt.

Es ist offenbar die Abweichung von der Normokapnie schlechthin, die die Änderung des M.I.D. im Sinne einer Erhöhung oder Erniedrigung herbeiführt. Da der M.I.D. von zentralnervösen und von peripheren Einflüssen, wie z. B. vom Stoffwechsel des Muskels (und damit indirekt auch von peripheren zirkulatorischen Vorgängen) abhängt (BUDELMANN [8]), so ist es schwer, zu entscheiden, wo die Kohlensäure als Regulans angreift. Sie könnte es direkt über die nervösen Zentren tun oder indirekt über die Durchblutungsänderungen, die sie verursacht. Wenn der zentralnervöse Einfluß hierbei in den Vordergrund gestellt wird, so geschieht dies deshalb, weil Hyperkapnie die Durchblutung in ruhenden Organen drosselt (REIN und OTTO[14]) und weil bei Muskelarbeit, die — wie wir sahen — auch im ruhenden Muskel eine M.I.D.-Steigerung hervorrief, eine allgemeine Erregbarkeitszunahme der Zentren besteht, auch wenn man berücksichtigen muß, daß Adrenalin, das bei Muskelarbeit aus den Nebennieren ausgeschüttet wird, eine M.I.D.-Erhöhung verursacht (BUDELMANN [8]). Es würde dann die Änderung des Venomotorentonus durch die Größe der CO_2-Spannung (GOLLWITZER-MEIER[15]) gleichsinnig gehen mit der Beeinflussung des M.I.D. oder mit anderen Worten: Hemmung oder Förderung des venösen Rückflusses des Blutes zum Herzen würde, in allen seinen Hilfsmechanismen, auf die früher hingewiesen wurde (FREY [3]) von der CO_2-Spannung gesteuert.

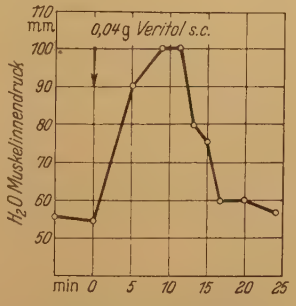


Abb. 4. Vers.-Nr. 16. K., ♂, 34 Jahre. 31. 1. 42. Erhöhung des Muskelinnendruckes (gemessen im Musc. biceps brachii) durch 0,04 g Veritol subkutan.

Neben den erwähnten Änderungen im Venendruck und im M.I.D. käme bei Hyperkapnie noch eine vermehrte Kaliberschwankungsübertragung von der innendruckgesteigerten Arterie (SCHADE[1]) hinzu. Weiter verstärken sich bei CO_2-Hyperventilation die Schwankungen im positiven Bauch- und negativen Pleuradruck, die beide in ihren absoluten Größen durch Erhöhung der Atemmittellage außerdem gesteigert sind. Schließlich kann die bei Hyperventilation verstärkte und mit der Atmung wechselnde Dehnung und Stauchung von abdomineller und thorakaler Hohlvene (BENNINGHOFF[16]) einen Beitrag zur Förderung des Rückflusses von Venenblut zum Herzen leisten. — Man könnte sich auch denken, daß die festgestellte antithrombotische Wirkung und damit Hintanhaltung der Emboliegefahr von einigen Sympathikomimetika (z. B. Sympatol) auf der Verhinderung des übermäßigen Liegenbleibens des Blutes durch eine M.I.D.-Steigerung beruhe.

Zusammenfassung.

Kontraktion der Venomotoren und damit Erhöhung des Venendruckes ist bei Hyperkapnie nicht allein für das gesteigerte Blutangebot zum Herzen verantwortlich zu machen, sondern es kommt bei diesem Vasomotorenreiz *durch die Kohlensäure* gleichfalls zu einer *Steigerung* aller Hilfsmechanismen (Frey[3]) für den venösen Blutrückfluß, wie hier am *Muskelinnendruck* dargetan werden konnte. Sinkt die CO_2-Spannung des Blutes, so wird der Rückfluß aus dem großen Kreislauf aus allen genannten Gründen vermindert, wie es sich bei Erkrankungen oftmals deletär auswirken kann. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß bei alleinigem starkem Versagen eines der Hilfsmechanismen ebenso ein Flüssigkeitsübertritt aus den Kapillaren in die umgebenden Gewebe oder ein Kreislaufkollaps eintreten kann, wie bei überstarker CO_2-Abrauchung, z. B. bei starken Varizen, bei schlaffen Muskeln im Verlauf langwieriger Knochenbruchheilung und anderem mehr, wie ebenso klinische Erfahrungen lehren.

Die gute Wirkung des *Veritols* als Blutrückflußförderer zum Herzen macht sich auch in einer *Erhöhung der Skelettmuskelspannung* kenntlich.

Literatur.

[1] Schade, Hepp, Pich u. v. Pein: Z. Kreisl.forsch. **28**, 181, 153 (1936). — [2] Mateeff: Klin. Wschr. **1936 I**, 421. — Mateeff u. Petroff: Z. exper. Med. **85**, 115 (1932). — Klin. Wschr. **1934 I**, 217. — Mateeff u. Schwarz: Pflügers Arch. **236**, 77 (1935). — [3] Frey: Arch. Kreisl.forsch. **7**, 329 (1940). — [4] Schwarz: Luftf.med. **1**, 82 (1937); **3**, 244 (1939). — [5] Frey u. Holtz: Einwirkung von Änderungen der Blutgase auf die Nagelfalzkapillaren des Menschen (noch unveröffentlicht). — [6] Henderson: Münch. med. Wschr. **1936 I**, 306. — Atmung, Erstickung, Wiederbelebung. Leipzig 1941. — [7] Beiglböck u. Junk: Z. klin. Med. **131**, 241 (1936). — [8] Budelmann: Arch. Kreisl.forsch. **9**, 191 (1942). — [9] Nielsen: Zit. nach Opitz, Klin. Wschr. **1941 II**, 1161. — [10] Rein, Otto u. Loose: Z. Kreisl.forsch. **33**, 241 (1941). — [11] Rein: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **187**, 617 (1937). — [12] Grosse-Brockhoff u. Malineus: Dtsch. Arch. klin. Med. **185**, 511 (1940). — [13] Frey u. Küchle: Luftf.med. **7**, 260 (1942). — [14] Rein u. Otto: Pflügers Arch. **243**, 303 (1940). — [15] Gollwitzer-Meier: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **40**, 425 (1928). — Erg. Physiol. **34**, 1160 (1932). — [16] Benninghoff: Nauheim. Fortbild.lehrg. **11**, 1 (1935).

A. I. Clark zum Gedenken.

Den Sinn internationaler Freundschaft auf der Basis gemeinschaftlichen wissenschaftlichen Interesses erleben heißt, schönsten Menschentums zutiefst teilhaftig werden. Das Streben nach Erkenntnis führt zum geistigen Kontakt, der schließlich in der menschlichen Berührung seine Vollendung erfährt. Diese Seite der internationalen Wissenschaftsgemeinschaft tritt besonders eindringlich dann in unser Bewußtsein, wenn das Erdendasein eines Gelehrten seinen natürlichen Abschluß findet. A. I. Clark ist ein Gelehrter und Mensch von solcher Art und Größe im besten Sinne. Als die ernste Kunde von seinem Tode zu uns kam, waren seine deutschen Freunde tief betroffen. Wir gedenken A. I. Clarks in wahrhafter Trauer. Fast zu gleicher Zeit wie sein Freund Straub hat er sein irdisches Dasein vollendet. Es erscheint uns kein blinder Zufall, daß die Namen dieser beiden Männer, die in ihrer Wissenschaft so viel Gemeinschaft hatten, zu einer Zeit beeinander stehen, in der wir in Deutschland des menschlichen Beistandes unserer Freunde im Ausland so ganz besonders bedürfen. Von den wahren Gelehrten aller Länder wurde die ungeheure Tragik der letzten Jahrzehnte und Jahre in einem geradezu ungeahnten Maße empfunden. Die so enge Fühlung mit den Pharmakologen und Physiologen der englisch sprechenden Länder und den Unseren ist das Werk solcher Männer, die bis zum letzten Augenblick getreu ihrer Art den Glauben an den wahren Sinn menschlichen Daseins sich bewahrt haben, so wie es bei Clark der Fall war.

A. I. Clark war nicht nur ein hervorragender Pharmakologe, sondern ein Mensch von umfassendem und tiefem Wissen und Können in Natur- und Geisteswissenschaft. Wer das Glück gehabt hat, in den 20er Jahren am University College-London das Dreigestirn E. H. Starling, A. I. Clark und A. V. Hill zu erleben, dem werden die gemeinsamen Gespräche dieser großen Gelehrten zur täglichen Teestunde ein unvergeßlicher Schatz der Erinnerung sein. Hier konnte man ganz besonders den Ideenreichtum und die geistige Lebendigkeit Clarks bei der Diskussion allgemein biologischer Probleme erkennen und bewundern lernen. Unter den Großen der Medizin schätzte er besonders Claude Bernard und wies oft auf dessen wundervolle Definition der experimentellen Medizin: «La médicine expérimentelle, par sa nature même de science expérimentale n'a pas de système et ne repousse rien en fait de traitement ou de guérison de maladies: elle croit et admet tout, pourvu que celà soit fondé sur l'observation

et prouvé par l'expérience.» Getreu diesen Worten hat er in Zusammenarbeit mit seinen Schülern in einem außerordentlichen Umfange experimentelle Arbeit geleistet, die letzten Endes allgemein pharmakologische Gesichtspunkte zum Grunde hatte. Clarks Buch „*The Mode of Action of Drugs on Cells*" war der Niederschlag des einzigartigen Könnens dieses Gelehrten. Gasser charakterisierte diese Leistung damit, daß er dem Sinne nach sagte, es sei das klügste Buch, das ihm die Bedeutung der Pharmakologie für allgemein biologische Probleme gelehrt habe. Ein besseres Urteil als dieses von berufener Seite ist nicht vorstellbar. Ganz besondere Dankbarkeit aber schuldet die Pharmakologie Heubner, dem es gelang, Clark für die Darstellung „*General Pharmacology*" im Handbuch der Pharmakologie zu gewinnen. Diese Darstellung darf mit Fug und Recht als die beste der Allgemeinen Pharmakologie angesehen werden. Welches Maß der Beherrschung der Chemie, Physikalischen Chemie und Physik tritt einem hier entgegen. Nur von einer solchen Grundlage aus konnte ein so wichtiges Gebiet wie die Allgemeine Pharmakologie eine derartige souveräne Darstellung wie in der „General Pharmacology" erfahren. Mit dieser großen Arbeit hat Clark unserer verhältnismäßig jungen Wissenschaft einen unschätzbaren Dienst geleistet. Besonders erwähnenswert ist die ungewöhnliche Beherrschung und Berücksichtigung der dieses Gebiet betreffenden Literatur.

Aber nicht nur dem Fachspezialisten hat er durch sein Schaffen Aufklärung und Anregungen vermittelt, sondern auch um den Unterricht der Studenten in der Pharmakologie hat er sich gleichermaßen bemüht.

Sein Lehrbuch „Applied Pharmacology" kann seiner wissenschaftlichen Hauptarbeit würdig an die Seite gestellt werden. Eine eindringliche und plastische Darstellungsart erleichtert dem Studenten Zugang auch zu schwierigeren Problemen unseres Faches.

Als Mensch war Clark von großer Schlichtheit und wahrhafter Herzensgüte. Ein großer Freund der Natur und besonders der Wälder wanderte er gern. Ländliche Einfachheit liebte er überaus und seine menschliche Aufgeschlossenheit offenbarte sich so recht bei gemeinsamen Waldspaziergängen, wo er über Flora und Fauna genau so schön zu plaudern wußte, wie er über schwierige wissenschaftliche Probleme klar und eindringlich zu diskutieren verstand.

Die Aufgabe unseres Dankes diesem großen Gelehrten und Menschen gegenüber sehen wir darin, daß wir sein geistiges Erbe im rechten Sinne pflegen. Dann wird sein Lebenswerk überzeitlich wirksam bleiben als *Dienst* an der *Menschheit* im Geiste *höchster Menschlichkeit*.

H. Gremels-Marburg a. d. Lahn.

Aus dem Chemotherapeutischen Laboratorium der Bayer-Forschungsstätten, Wuppertal-Elberfeld (Leiter: Prof. Dr. med. W. Kikuth).

Heinzkörper- und Methämoglobinbildung durch Methylenblau.

Von

Dr. Marianne Bock.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 15. Februar 1947.)

In Versuchen, mit Rickettsia mooseri infizierte Mäuse chemotherapeutisch zu beeinflussen, wurde von Kikuth und Schilling das Methylenblau als wirksam erkannt. Es zeigte sich, daß nach günstig gewählten Dosen die Tiere im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen wesentlich verzögert eingingen. Bei Durchmusterung des Blutbildes der so behandelten Tiere fanden Kikuth und Schilling Veränderungen in den roten Blutkörperchen, die sich bei Vitalfärbung mit Nilblausulfat als außerordentlich große Heinzkörperchen (HK) erwiesen. Da diese auch bei gesunden, nur mit Methylenblau behandelten Mäusen in derselben Weise auftraten, mußte allein die Substanz für ihre Entstehung verantwortlich gemacht werden. Der Spättod der Versuchsmäuse, der nicht immer durch Rickettsienbefund erklärt werden konnte, ist daher sicherlich zum Teil auf die starke Anämie zurückzuführen, die der durch Methylenblau bedingten HK-Bildung folgt.

Über die Entstehung dieser Körperchen durch Methylenblau, einen Thiazinfarbstoff, konnten wir in der Literatur keine Angaben finden. HK lassen sich, wie schon vielfach mitgeteilt, in erster Linie durch Methämoglobinbildner erzeugen. Daß auch das Methylenblau Methämoglobin (MetHb) zu bilden vermag, wurde schon 1891 von Combemale erwähnt, der bei Hunden nach Gaben von 0,5 g/kg (innerlich) eine MetHb-Ämie nachweisen konnte.

I. In vivo-Versuche.

a) Säugetiere.

Zur Durchführung eigener Versuche, in denen wir die Wirkung des Methylenblaus auf das Blut studieren wollten, benutzten wir die gebräuchlichsten Laboratoriumstiere, wie Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Katze und Hund, denen die Substanz in wäßriger Lösung subkutan und intravenös verabreicht wurde. Die anschließenden Blutuntersuchungen erfolgten nach den üblichen klinischen Methoden. Zur MetHb-Bestimmung wurde das Spektralkolorimeter angewandt, mit dem sich gute Vergleichswerte gewinnen ließen.

1. Subkutane Injektionen. Methylenblau, subkutan verabreicht, wird schnell resorbiert. Kurze Zeit nach der Injektion kann man bei den behandelten Tieren eine Blaufärbung der Gewebe (z. B. Haut, Zahnfleisch, Skleren) und des Harns beobachten. Ein Teil der sehr intensiv färbenden Substanz läßt sich aber auch noch lange Zeit an der Injektionsstelle nachweisen. Hier wirkt sie nekrotisierend und kann erhebliche Gewebszerstörungen verursachen. So entstanden bei den Tieren offene Nekrosen bis zu Handtellergröße, die nach einigen Wochen unter Narbenbildung zur Abheilung gelangen konnten.

50 mg/kg Methylenblau wurden in unseren Versuchen von allen Tierarten vertragen. Bei Katze und Hund wirkten 75 mg/kg und beim Meerschweinchen 100 mg/kg tödlich. Auch bei der Maus erwiesen sich 100 mg/kg als Grenzdosis, da hiernach ein Teil der Tiere einging. Ratte und Kaninchen dagegen zeigten nach einer Gabe von 100 mg/kg keine äußeren Krankheitssymptome. Nach der Injektion kam es bei den Katzen zum Erbrechen von blaugefärbtem Speisebrei. Im allgemeinen hatten die Tiere, die mit toxischen Dosen behandelt waren, starken Durst und waren sehr matt. Der Tod erfolgte nach 2—8 Tagen. Bei den Sektionen der verendeten Tiere zeigten sich je nach dem Zeitpunkt des Todes eine mehr oder minder deutliche, durch MetHb-Ämie bedingte Braunfärbung der Gewebe, die zum Teil von einer Blaufärbung, besonders in der Herz- und Pylorusmuskulatur und in der Niere, überdeckt wurde.

Bei jeder Tierart konnten wir nach der Injektion von Methylenblau MetHb im Blut nachweisen. Die besten MetHb-Bildner waren jedoch Hund und Katze.

Eine Stunde nach toxischen Methylenblauinjektionen wurde im Blut der Versuchstiere stets eine größere Menge MetHb gefunden. So wurde z. B. bei einer Katze, die 75 mg/kg Substanz erhielt, zu diesem Zeitpunkt 1,9 g-% (= 12,5%, bezogen auf den gesamten Blutfarbstoff) nachgewiesen. Bei der Maus entstand im allgemeinen das MetHb etwas verzögert, so daß das Maximum des Anstieges erst nach 2—3 Stunden erreicht wurde. Im Verlauf der folgenden Stunden sank der MetHb-Wert bei allen Tierarten ab, um später erneut anzusteigen, so daß wir eine Kurve erhielten, die meist mehrere Gipfel aufwies. Als Beispiel wird eine Abbildung gebracht, die die MetHb-Werte bei Hund, Katze und Maus nach Gaben von 75 bzw. 100 mg/kg wiedergeben. Bei einem Hund und 2 Katzen, die am 6. bzw. 2. Tage verendeten, kam es zu diesem Zeitpunkt zu einem starken MetHb-Anstieg (38 bzw. 33 und 55%).

Das weiße Blutbild war im allgemeinen unverändert. Teilweise auftretende, nicht sehr beträchtliche Leukozytosen sind auf die lokalen Nekrosen an den Injektionsstellen zurückzuführen.

Im roten Blutbild dagegen konnten als Folgen der Schädigung des tierischen Organismus durch Methylenblau erhebliche Veränderungen

festgestellt werden. Es trat nämlich eine Anämie auf, die je nach der Dosierung des Methylenblaus zum Tode des betreffenden Versuchstieres führte oder wieder zur Ausheilung gelangte. Die Anämie konnte ziemliche Ausmaße annehmen, so war z. B. bei einem Hunde, der 50 mg/kg Methylenblau erhalten hatte, 7 Tage danach die Zahl der roten Blutkörperchen von 5,7 auf 2,9 Millionen und der Hb-Wert von 114 auf 50% (Sahli) abgesunken. Bei einer Katze, die 75 mg/kg bekam und in der Nacht vom 6. zum 7. Tage verendete, wurden am 4. Versuchstage

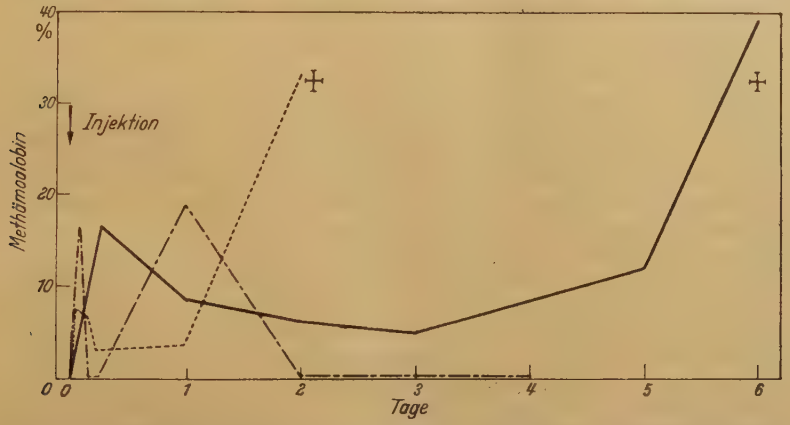


Abb. 1. Methämoglobinbildung. —— Hund 75 mg/kg Methylenblau subkutan; ------ Katze 100 mg/kg Methylenblau subkutan; -·-·— Maus 100 mg/kg Methylenblau subkutan.

2,68 Millionen Erythrozyten und 22% Hb und am 6. Tage 0,9 Millionen Erythrozyten und 10% Hb bestimmt (Ausgangswerte waren 10,5 Millionen Erythrozyten und 90% Hb). Bei einer Erholung der Tiere fanden sich im Blutbild alle Zeichen einer vermehrten Regeneration, bei der besonders die starke Zunahme der Retikulozyten (in einigen Versuchen bei Kaninchen und Ratten sogar bis zu 30 bzw. 42,5%) bemerkenswert war.

Von besonderem Interesse war für uns die Bildung von HK in den Erythrozyten der mit Methylenblau vergifteten Tiere. Die HK — in unseren Versuchen durch Vitalfärbung mit Nilblausulfat dargestellt —, die bei der Maus nach Methylenblau gebildet wurden, traten z. B. nach 50 mg/kg in 100% der Erythrozyten auf und entwickelten sich zu beträchtlicher Größe. Nach subkutaner Verabreichung von 10 mg, 5 mg und 2,5 mg/kg wurden HK nur in einem Teil der Erythrozyten beobachtet; sie blieben auch an Größe hinter denen nach 50 mg/kg deutlich zurück. 1 mg/kg ließ das Blutbild praktisch unverändert. Auch die übrigen Tierarten (Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen und Ratte) wiesen nach entsprechenden Dosen von Methylenblau HK auf. Besonders gut war die Bildung bei Katze und Hund zu verfolgen, bei

denen die HK auch in 100% der Erythrozyten auftreten konnten. Beim Kaninchen entstanden selbst bei hohen Dosen HK nur in einem Teil der Erythrozyten. Noch schlechtere HK-Bildner nach Methylenblau sind die Ratte und das Meerschweinchen, bei dem z. B. nach 100 mg/kg erst am 3. Tage das Maximum der Bildung mit 27,5% erreicht wurde, während bei den übrigen Tieren die Höchstzahl der HK bereits nach 6—24 Stunden zu verzeichnen war.

Bei allen Tierarten sind die KH kurz nach ihrer Entstehung zunächst klein und wachsen je nach Substanz und Dosis zu beträchtlichen Größen heran. Methylenblau verursacht nach unseren Erfahrungen im Vergleich zu anderen Substanzen besonders große Körperchen.

Gesunde, unbehandelte Hunde, Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten haben keine HK. Bei der Katze können sie aber in wechselnder Menge, im Durchschnitt in etwa 20% der Erythrozyten nachgewiesen werden. Im normalen Mäuseblut sind bei Vitalfärbungen in einzelnen Erythrozyten Granula zu erkennen, die wahrscheinlich ebenfalls als KH gedeutet werden müssen. Im Rattenblut sind zwar auch einzelne sich blaufärbende Körperchen vorhanden, die aber verwaschener sind als die im Mäuseblut. Es ist anzunehmen, daß es sich hier um Reste der Retikulozytenstruktur handelt, die beim Altern der Zellen abblassen.

Die HK in den Erythrozyten der verschiedenen Tiere sind nach der Vergiftung zunächst sehr fein, meist einfach, zum Teil auch multipel vorhanden. Später wachsen sie heran, erreichen bei Katze und Maus eine beträchtliche Größe, erscheinen hier aus mehreren zusammengesetzt und sind dann einzeln, manchmal auch zu mehreren, in den roten Blutkörperchen gelegen. Beim Kaninchen und auch beim Meerschweinchen erreichen sie dagegen nicht diese Größe. Bei Ratten und Hunden sind zu einem bestimmten Zeitpunkt die HK in großer Zahl in den einzelnen Erythrozyten vorhanden, so daß es bei der Auszählung schwer, wenn nicht unmöglich ist, diese Zellen von den Retikulozyten zu unterscheiden, zumal jene bei den Ratten infolge ihres verschiedenen Alters ein unterschiedliches Aussehen haben können, da die größeren, d. h. jüngeren Formen eine intensiv gefärbte, grobe Struktur und die älteren Zellen dagegen eine zartere Zeichnung aufweisen. In einem späteren Stadium ballen sich die HK bei der Ratte stärker zusammen und imponieren dann als große Gebilde, die einzeln oder multipel vorhanden sein können. Beim Hund ist die Tendenz zur Zusammenballung nicht so groß.

Nach einmaliger Methylenblauvergiftung nimmt nach einigen Tagen die Zahl der HK ab, so daß diese nach etwa 2—3 Wochen aus dem Blut wieder verschwunden sind. Es ist anzunehmen, daß sich in dieser Zeit das Blut völlig regeneriert hat.

In vital gefärbten Ausstrichen, die von schwer geschädigten Tieren stammten, konnten wir verschiedentlich, besonders gut aber bei einem Hund und bei einer Katze, die 75 mg/kg Methylenblau erhalten hatten, blaue feine Granula erkennen. Sie lagen der zum Teil abgehobenen Erythrozytenmembran an und lieferten so Bilder, die mit denen eine gewisse Ähnlichkeit aufwiesen, die JUNG mit dem Elektronenmikroskop nach Phenylendiaminvergiftung gewonnen hat. Die nach der Phenylendiaminvergiftung beobachtete Erythrozytendegeneration faßt JUNG als Zerstörung der Membran auf. Es ist anzunehmen, daß es sich auch bei

unseren Ausstrichen, die meist kurze Zeit vor dem Exitus letalis der Tiere hergestellt waren, um ähnliche Veränderungen handelte, und daß demnach das Auftreten von Granula als Alterungs- und Degenerationserscheinung der roten Blutkörperchen angesehen werden muß.

2. Intravenöse Injektionen. Um eine Depotbildung im subkutanen Gewebe zu vermeiden, haben wir bei einigen Katzen und Kaninchen die Substanz direkt in die Blutbahn gebracht, da wir annahmen, daß der protrahierte Verlauf der MetHb-Kurven zum Teil durch das Substanzdepot bedingt sei. Wenn man davon absieht, daß die kleinste tödliche Dosis nach intravenöser Verabreichung niedriger liegt (bei Katze und Kaninchen bei 30 mg/kg), haben diese Versuche jedoch kaum andersartige Ergebnisse gehabt als die nach subkutaner Injektion. Es kam nach der intravenösen Injektion ebenfalls zur Anämie mit stark reduzierten Erythrozyten- und Hb-Werten und bei der Erholung der Tiere zur Blutregeneration. Die MetHb-Kurve zeigte gleichfalls einen mehrgipfligen Verlauf, allerdings wurden Normalwerte entsprechend den geringeren Substanzdosen schon nach kürzerer Zeit erreicht als nach subkutanen Injektionen. Wie an der deutlichen, mehrere Tage bestehenden Blaufärbung der Haut festzustellen war, kommt es also auch nach intravenöser Verabreichung von Methylenblau zu einer vorübergehenden Speicherung der Substanz in den Geweben.

b) Kanarienvogel.

Im Anschluß an diese Versuche wurde das Methylenblau von uns auch am Kanarienvogel geprüft. Da von dieser Tierart die perorale Verabreichung von Substanzen am besten vertragen wird, haben wir diese Applikationsart gewählt. Trotz hoher Methylenblaugaben, bis zu 100 mg/kg Tier, konnten wir in den kernhaltigen Erythrozyten keine HK erzielen. Allerdings waren bei der Vitalfärbung in den roten Blutkörperchen eine netzartige Struktur und einzelne blaue Körnchen zu erkennen, die aber auch normalerweise vorhanden waren und sich nach Methylenblaugaben weder vermehrten noch an Größe zunahmen, so daß sie mit den HK in dem Blut der von uns untersuchten Säugetiere nicht identisch sein können. Von besonderem Interesse war daher die Feststellung, daß die Kanarienvögel auf entsprechende Methylenblaugaben regelmäßig deutlich MetHb bildeten.

II. In vitro-Versuche.

a) HK-Bildung.

Wie bekannt lassen sich auch außerhalb des Tierkörpers durch verschiedene Substanzen HK im Blut erzeugen. Wir haben daher Versuche angesetzt, um festzustellen, ob auch Methylenblau dazu in der Lage ist.

Zu diesem Zweck wurde Mäuseblut entnommen, gewaschen, die Waschflüssigkeit entfernt und die Blutkörperchen mit einer Methylenblaulösung von 1:5000 in physiologischer Kochsalzlösung auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt. Das Blut-Substanzgemisch wurde bei 37° gehalten und zu verschiedenen Zeiten etwas davon für Vitalfärbungen entnommen.

Nach einer Einwirkungsdauer von 2 Stunden konnten in einem Teil der Erythrozyten sehr feine HK beobachtet werden, nach 4 Stunden waren diese praktisch in allen roten Blutkörperchen zu erkennen. Sie waren etwas größer als vorher, zum Teil multipel, zum Teil nur in der Einzahl vorhanden. Viele Erythrozyten wiesen außerdem eine feine blaue Granulation auf, die aber wahrscheinlich als Zeichen einer Schädigung bzw. als ein beginnendes Absterben der Erythrozyten gedeutet werden muß. Sie ist im Aussehen zarter als die HK, die im Anfangsstadium der Bildung oft auch multipel sind.

b) Methämoglobinbildung.

Wie aus den Versuchen am Tier hervorgeht, kann die MetHb-Bildung nicht nur von der Substanzkonzentration direkt abhängig sein, da wir wiederholt beobachten konnten, daß nach der Abnahme des zuerst gebildeten MetHbs im weiteren Verlauf der Untersuchungen erneut größere Mengen nachgewiesen werden konnten.

Um unter klareren Verhältnissen als im Tierkörper dieser Frage nachgehen zu können, haben wir im Reagenzglas hämolysiertes Blut mit verschiedenen Substanzverdünnungen vermischt und dann auf Anwesenheit von MethHb geprüft. Im Spektrum lassen sich die dem Methylenblau zugehörigen Absorptionsstreifen gut von denen des MetHb unterscheiden.

Bei Zusatz einer Methylenblaulösung 1:500 zu Mäuseblut herrschte im spektroskopischen Bild die Absorptionslinie der Substanz vor, so daß das MetHb schwer zu erkennen und zu bestimmen war. Bei einer Substanzlösung von 1:1000 wurden 28% MetHb gefunden. Zusatz geringerer Konzentrationen brachte entsprechend niedrigere Werte. Bei 1:500000 wurden nur noch ganz geringe Spuren von MetHb festgestellt.

Versuche, die mit *Ratten*blut in derselben Weise angesetzt wurden, lieferten entsprechende Ergebnisse.

III. Vergleichsversuche mit Thionin.

Thionin ist als Kern im Methylenblau enthalten; letzteres ist als Tetramethylderivat des Thionins aufzufassen. Es lag daher nahe, mit dieser Substanz Vergleichsversuche anzustellen. Hierbei erwies sich auch das Thionin als ein guter HK-Bildner, denn es gelang uns, entsprechend den Methylenblauversuchen bei Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen und Ratte, mit 100 mg/kg und bei der Maus mit 50 mg/kg nach kurzer Zeit HK zu erzeugen. Das Krankheitsbild bei den verschiedenen Tierarten entsprach dem nach der Methylenblau-

vergiftung beschriebenen. Es entwickelte sich ebenfalls eine mehr oder weniger ausgesprochene Anämie, und bei der Erholung traten Regenerationserscheinungen im Blutbild auf. Auch MetHb ließ sich im Blut der behandelten Tiere und im Reagenzglasversuch nachweisen.

IV. Besprechung der Ergebnisse.

Methylenblau ist, wie wir bei unseren Versuchstieren nachweisen konnten, ein guter HK- und MetHb-Bildner. Wie Heubner betonte, entstehen beide, sowohl die HK als auch das MetHb durch Oxydationsprozesse. Dabei beruht die HK-Bildung auf tiefergehenden Oxydationen als das Entstehen des MetHb.

Die nach günstig gewählten Gaben von Methylenblau bei den Säugetieren beobachteten Bildungen von HK und MetHb treten unabhängig voneinander auf, d. h. wenn es sich auch bei beiden wohl um oxydative Prozesse handelt, so ist doch nicht der eine direkte Folge des anderen Vorganges. So konnten wir verschiedentlich feststellen, daß es nach Injektion der Substanz sehr bald zur Bildung von MetHb kam, das in kurzer Zeit sein Maximum erreichte. Zu diesem Zeitpunkt war die HK-Bildung oft noch nicht auf dem Höhepunkt angelangt und verlief trotz Absinken des MetHb-Wertes noch weiter. Daß außerdem die HK nicht nur an Zahl, sondern auch an Größe noch zunahmen, mag dahingestellt bleiben, denn man kann sich denken, daß ein einmal eingeleiteter Prozeß vollständig abrollt, auch wenn die auslösende Ursache nicht mehr vorhanden ist.

Eine weitere Stütze der auch von Heubner und seiner Schule vertretenen Anschauung, daß MetHb- und HK-Bildung nicht miteinander verkoppelt sind, bedeutete die Beobachtung, daß es beim Kanarienvogel nach Verabreichung größerer Methylenblaumengen wohl zum Auftreten von MetHb kam, daß aber die HK dagegen in den kernhaltigen Vogelerythrozyten nicht nachgewiesen werden konnten.

HK-Bildung an sich wird von den Tieren vertragen. Es ist bekannt, daß z. B. Katzen mit stark HK-haltigem Blut (~100%) über Wochen und Monate bei relativ gutem Allgemeinbefinden am Leben gehalten werden konnten (Gross, Bock und Hellrung). In diesem Falle wurde durch starke Blutregeneration dem vermehrten Abbau des Blutes die Waage gehalten, so daß Hb- und Erythrozytenzahlen nicht unter die zur Erhaltung des Lebens notwendigen Werte absanken.

Der auffälligste Befund, den wir nach den Methylenblauinjektionen erheben konnten, war die Beobachtung, daß es im Verlauf der MetHb-Kurve zu 2 oder mehr Gipfeln kam. Dabei lag der zweite maximale MetHb-Wert mitunter so hoch, daß sich die Tiere nicht wieder erholen konnten, sondern an einer MetHb-Ämie eingingen. Da bei diesen Tieren der Hb-Wert stark abgesunken war, konnte es vorkommen, daß schon

bei einem verhältnismäßig geringen Prozentsatz des gebildeten MetHb die absolute OxyHb-Menge für den Atmungsprozeß nicht mehr ausreichte. Blieben die MetHb-Werte niedriger, so kam es, nachdem auch die Anämie zurückgegangen war, wieder zu einer völligen Wiederherstellung der Versuchstiere.

Methylenblau wirkt oxydierend und wird dabei selbst zu einer farblosen Leukoverbindung. Wir konnten bei Sektionen verschiedentlich beobachten, daß die Gewebe bei Luftzutritt sich intensiv blau färbten, der Farbstoff nahm also erneut Sauerstoff auf und wirkte dadurch wiederum reduzierend. Wir haben also einerseits gesehen, daß Methylenblau MetHb zu bilden vermag, wissen aber, daß es umgekehrt auch in solchen Fällen gegeben wird, bei denen — wie z. B. nach Sulfonamiden — eine MetHb-Ämie besteht, um diese zurückzubilden (ZIERZ). Auch Thionin *(Katalysin)*, das sich in unseren Versuchen ähnlich verhielt wie Methylenblau, wurde nach GROSCURTH bei Zuständen von Anoxie mit gutem Erfolg angewandt. Mit Thionin gelingt es ebenso wie mit Methylenblau in vitro und auch in vivo, MetHb in funktionstüchtiges Hb umzuwandeln (HAUSCHILD; SAGEL, zit. nach GROSCURTH). Durch diese günstige Lagerung des Redoxpotentials von Methylenblau und Thionin lassen sich vielleicht auch die von uns als auffällig herausgestellten Befunde, die wir bei den MetHb-Bestimmungen erzielten, bis zu einem gewissen Grade deuten. Ob aber neben der langsamen Resorption des Methylenblaus bzw. des Thionins vom subkutanen Gewebe der Injektionsstelle aus und neben den im tierischen Organismus parallel verlaufenden oxydierenden und reduzierenden Prozessen noch andere Faktoren, wie z. B. Umwandlung des Methylenblaus in eine andere MetHb-bildende Substanz, bei der Entstehung des MetHbs mitbestimmend sind, kann im Augenblick nicht geklärt werden.

Zusammenfassung.

1. Nach subkutaner bzw. intravenöser Injektion von Methylenblau traten bei Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Katze und Hund in den Erythrozyten HK und eine hierdurch bedingte starke Anämie, sowie MetHb auf. Maus, Katze und Hund erwiesen sich als besonders gute HK-Bildner.

2. Infolge der schnellen Resorbierbarkeit der Substanz waren HK und MetHb schon kurze Zeit nach der Verabreichung zu finden. Ein Teil des Methylenblaus blieb an der Injektionsstelle liegen und führte hier zu lokalen Nekrosen oder wurde vorübergehend, wie bei den Sektionen festgestellt werden konnte, in den Organen gespeichert.

3. Auffällig war der Verlauf der MetHb-Kurve, die nicht nur einen einzigen, kurze Zeit nach der Substanzverabreichung auftretenden Anstieg mit anschließend mehr oder weniger steil verlaufendem Abfall

aufwies, sondern sich durch einen mehrgipfeligen protrahierten Verlauf auszeichnete.

4. Beim Kanarienvogel gelang es nicht, HK in den Erythrozyten nachzuweisen, obwohl MetHb gebildet wurde.

5. Nicht nur im Organismus der Tiere, sondern auch im Reagenzglasversuch vermochte Methylenblau im Ratten- und Mäuseblut HK und MetHb zu bilden.

6. Versuche mit Thionin führten zu den gleichen Ergebnissen wie die mit Methylenblau.

Literatur.

Combemale: C. r. Soc. Biol. **43**, 300 (1891). — Groscurth, G.: Med. Welt **1940**, 629. — Gross, E., M. Bock u. F. Hellrung: Arch. exper. Path. (D.) **200**, 271 (1942). — Hauschild, F.: Arch. exper. Path. (D.) **182**, 118 (1936); **184**, 485 (1937). — Heubner, W.: Klin. Wschr. **1941**, 137. — Jung: Naturw. **30**, 472 (1942). Kikuth, W. u. I. Schilling: Zbl. Bakter. usw. I Orig. **151**, 293 (1944). — Sagel, G.: Inaug.-Diss. Leipzig 1937. — Zierz, P.: Med. Klin. **1940**, 37.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin und dem Laboratorium für Übermikroskopie der Siemens & Halske AG., Berlin-Spandau.

Zur Pathologie der roten Blutkörperchen.

IV. Mitteilung *.

Über die hämolytische Wirkung des Arsenwasserstoffs.

Von

Fritz Jung,

z. Z. Würzburg.

Mit 10 Textabbildungen.

(Eingegangen am 22. Januar 1947.)

In den vorhergehenden Mitteilungen ist das Verhalten der roten Blutkörperchen gegenüber verschiedenartigen Schädigungen in vitro und vivo geschildert worden, wobei es gelungen war, die Natur einer Anzahl pathologischer Erscheinungen, die durch hämolytische Gifte hervorgebracht werden, zu klären. Die folgende Untersuchung setzte sich das Studium der hämolytischen Wirkung des Arsenwasserstoffs zum Ziel; sie konnte nicht ganz zu Ende geführt werden, doch soll über ihre Ergebnisse berichtet werden, da aus äußeren Gründen zunächst keine Aussicht auf Weiterführung der Arbeit besteht. Labes[1] hatte die hämolytische Wirkung des Arsenwasserstoffs als eine Wirkung kolloider Arsenteilchen erklärt, die bei der Oxydation des Arsenwasserstoffs durch den Blutsauerstoff entstehen und ähnlich wie kolloider Schwefel hämolytisch wirken sollen. Diese Ansicht ist aus folgenden Gründen nicht ganz befriedigend:

1. Wenn man eine mechanische Hämolyse der Art, wie sie etwa beim Schütteln von Erythrozyten mit Glaspulver entsteht, ausschließt, so sind hämolytische Wirkungen kleinster kolloider Teilchen nur verständlich, falls diese konkrete chemische Reaktionen mit der Substanz der Erythrozytenmembran eingehen können. Tatsächlich wird in den kolloiden As-Lösungen im Laufe einiger Wochen das As allmählich in Arsenige Säure umgewandelt, doch ist die Deutung der Hämolyse als Nebenreaktion dieser Umsetzung ebenso gesucht wie die Annahme einer mechanischen Hämolyse. Die letztere würde das Auftreten scharfkantiger Teilchen und eine heftige Agitation der Blutkörperchenaufschwemmung oder des Blutes voraussetzen, beides ist aber für die Arsenwasserstoffhämolyse nicht notwendig.

---

* II. Mitteilung: Naunyn-Schmiedbergs Arch. **204**. 139 (1947) III. Mitteilung: Klin. Wschr. **1947**, 459.

2. In den Versuchen von Labes zeigen nur hoch konzentrierte Arsensole eine hämolytische Wirkung. Diese hängt ferner vom Einwirkungsmodus ab: Die Sole flocken alle nach einer bestimmten Zeit; Hämolyse tritt nur ein, wenn die Erythrozyten und das Sol im Augenblick der Solflockung gemischt sind, wird das Sol vor der Flockungsperiode den Zellen zugesetzt und wieder entfernt, oder wird es nach der Flockung zugesetzt, so ist es wirkungslos. Das weist aber darauf hin, daß die hämolytische Wirkung einer Verunreinigung des Sols zukommen könnte, die fest an die Teilchen gebunden ist und bei dem Umladungsphänomen der Flockung frei wird. Auch die Verzögerung der Flockung wie der Hämolyse durch Sulfit kann ähnlich erklärt werden. Eine Verunreinigung des kolloiden As durch chemisch aktive Bestandteile ist bei der von Labes gewählten Herstellungsmethode seiner Sole fast unumgänglich.

3. Sehr geringe Mengen Serum hemmen die Hämolyse durch Arsensole. Ähnliche Hemmungswirkungen müßten in vivo einerseits dem Plasma, andererseits dem hochkonzentrierten Hämoglobin des Zellinneren zukommen. Auch ist Arsenwasserstoff auf Blut und Blutkörperchensuspensionen in Kochsalzlösung gleichermaßen hämolytisch wirksam.

Labes selbst weist noch auf eine andere Erklärungsmöglichkeit für die Hämolyse hin, indem er die Mitwirkung von Wasserstoffsuperoxyd in Betracht zieht. Wasserstoffsuperoxyd tritt bei der Oxydation von Arsenwasserstoff in alkalischer (Henze [2]) oder hämoglobinhaltiger (Jung [3]) Lösung intermediär auf: Die Umsetzung des Arsenwasserstoffs mit dem Hämoglobin und Luftsauerstoff gehört zu den sog. gekoppelten Oxydationen. Unter dem Einfluß des Katalysators Hämoglobin wird zunächst der Arsenwasserstoff durch den Sauerstoff oxydiert, wobei die Oxydationsreaktion den Sauerstoff aktiviert (Peroxydbildung). Er greift infolgedessen auch das Hämoglobin unter Hämiglobinbildung und schließlich Verdobildung bzw. Denaturierung an. Spielt sich diese Umsetzung innerhalb der roten Blutzelle ab, so wird sich die Denaturierung auch an deren Membran zeigen, d. h. die Zelle wird hämolysiert. Diese zweite Erklärungsmöglichkeit für die Hämolyse scheint uns einleuchtend. Die folgenden Versuche wurden zur Stützung dieser Hypothese und zur Prüfung der alten Ansicht von Labes vorgenommen. Sie schließen sich an Arbeiten über die hämolytische Wirkung des Phenylhydrazins, des Phenylendiamins und Kaliumchlorats an.

I. Hämolyseversuche mit kolloidem Arsen.

Um die Verunreinigung der As-Sole bei den von Labes gewählten Darstellungsverfahren zu vermeiden, versuchte ich brauchbare As-Sole mit Hilfe einer Dispergierung durch Ultraschall zu erzielen.

Arsenwasserstoff wurde gleichzeitig mit Sauerstoff in n/10-Natronlauge eingeleitet. Die Lösung nahm einen braunen Ton an und schließlich flockte

das allmählich fast schwarz gewordene Arsensol aus. Die Arsenflocken wurden durch Zentrifugieren bis zu 7mal mit destilliertem Wasser gewaschen und dann in wechselnden Konzentrationen in Tyrodelösung aufgeschwemmt. Diese Suspension kolloider Arsenteilchen wurde mit Hilfe eines hochfrequenten magnetostriktiven Schallgebers bis zu 30 Min. Dauer bestrahlt. Dabei löste sich die braune Flockung allmählich wieder. Die Suspension wurde durchsichtig, und schließlich waren alle groben Teilchen verschwunden und nur ein schwacher Tyndall-Effekt deutete auf die ursprüngliche Darstellung hin. Solche Sole waren ziemlich resistent, sie dürften wegen ihrer einfachen Darstellungsweise kaum Verunreinigungen enthalten. Um sie noch weiter zu definieren, wurden die Arsenteilchen übermikroskopisch dargestellt. (Allerdings flockten die Teilchen beim Eintrocknen auf dem Objektträgerfilm aus.) Die Teilchen besaßen eine Größe von etwa 30 mμ maximal, die kleinsten kamen bereits an die Grenze des Auflösungsvermögen des Übermikroskopes heran und dürften etwa 2—5 mμ Durchmesser gehabt haben. Wie eine Elektronenbeugung zeigte, hatten die Teilchen eine kristalline Struktur.

Einigen Präparationen wurde Serum vor der Beschallung zugegeben. Sie zeigten keine besonderen Eigenschaften. Die Dipersion wurde durch das Serum nicht sichtbar beeinflußt.

Zu sämtlichen Versuchen in vitro wurden menschliche rote Blutzellen verwandt, da diese besonders gut untersucht sind und stets als gleichmäßiges Material zur Verfügung stehen. Das Blut wurde in Zitrat aufgefangen und die Zellen durch Waschen mit Kochsalzlösung daraus isoliert. Zum Versuch wurden sie in Tyrodelösung aufgeschwemmt. Die Sole wurden im Verhältnis 1/1 mit den Zellsuspensionen gemischt. Schon nach kurzer Zeit setzten sich die Erythrozyten ab, während das braune, anscheinend unveränderte Sol überstand. Hämolyse wurde niemals erhalten.

Tabelle 1.

	Aussehen des Sol	Hämolyse	
		Nach 2 Stunden	Nach 24 Stunden
Arsensol I	dunkelbraun, leichter Tyndall-Effekt	—	—
Arsensol II	braun, Tyndall-Effekt. Sol nur in dünner Schicht durchsichtig	—	—

Serumhaltige Sole hatten ebensowenig eine hämolytische Wirkung. — Es sei darauf hingewiesen, daß ich schon früher[3] berichtet habe, daß Arsensole, welche durch Evakuieren AsH_3-frei gemacht wurden, nicht hämolysieren.

Rote Blutkörperchen wie isolierte Erythrozytenmembranen wurden mit Arsensolen gemischt und etwa 10 Min. beisammen gelassen. Dann

wurden die Membranen bzw. die Zellen abgetrennt und zur übermikroskopischen Untersuchung präpariert. In den Präparaten finden sich neben den Zellmembranen zahlreiche kleine Arsenteilchen, sie verteilten sich jedoch im Gesichtsfeld gleichmäßig über die Zellen und den leeren Objektträgerfilm. Eine Bindung oder Adsorption der Teilchen an die Zellmembranen kann demnach nicht stattgefunden haben.

Sicher arsenwasserstofffreie Arsensole besitzen demnach keine hämolytische Wirkung, auch werden die Teilchen nicht an die Erythrozyten adsorbiert.

II. Hämolyseversuche in vitro.

a) Arsenwasserstoff führt eine schnelle Hämolyse nur in Sauerstoffgegenwart bei Einwirkung in größerer Konzentration herbei. Meist zerfallen die roten Blutzellen erst längere Zeit, oft viele Stunden nach Berührung mit dem Gase. Die folgende Tabelle bringt eine Übersicht:

Tabelle 2.

Einwirkung	Farbe der Suspension	a) Hämolysegrad; b) Farbstoffgehalt der isolierten Stromata, nach Stunden: sofort	4 Stunden	24 Stunden	Farbstoff
20 Sek. AsH_3	violett-braun	a) — b) gering	a) ± b) leicht vermehrt	a) +++ b) leicht vermehrt	Hb (2) Hb (3)
1 Min. AsH_3	braun	a) — b) gering	a) ± b) leicht vermehrt	a) +++ b) leicht vermehrt	Hb (3) Verdo
1 Min. $AsH_3 + O^2$	braun-grün	a) ± b) grün-braune, farbstoffreiche, schnell sedimentierende Stromata, koagulierte Zellen und koagulierter Farbstoff	a) ±	a) ±	Hb (3) Verdo

b) Resistenzversuche. Die Technik war dieselbe wie in den vorangehenden Mitteilungen. Das Ergebnis ist in der Kurventafel dargestellt. Die Deutung derartiger Kurven ist an Hand der von WILBRANDT[4] entwickelten Vorstellungen ohne Schwierigkeit möglich. Es liegt eine ganz ausgesprochene Schwellungshämolyse (kolloidosmotische Hämolyse) vor, wie sie bei einer Aufhebung oder Verminderung der selektiven Permeabilität der Membran zustande kommt. Ganz analoge Vorgänge lassen sich bei der UV-Hämolyse (WILBRANDT[4]) und der Hämolyse durch Silbernitrat (JUNG, F. u. BLOESI, S., unveröff.) feststellen. Die Erscheinung geht auf eine geringgradige Denaturierung des Eiweißes der Erythrozytenmembran zurück, die sich weder morphologisch nach an der (sofort gemessenen) Resistenz ausdrücken muß.

Aus den abgebildeten Kurven läßt sich übrigens entnehmen, daß die Wasseraufnahme der Zellen in der Zeit ziemlich gleichförmig verläuft. Bei

nicht allzu intensiver und langer Einwirkung des AsH_3 geht die Schädigung der Zellen außerdem immer etwa gleich weit, d. h. die Hämolyse setzt etwa nach derselben Zeit ein. Das würde darauf hinweisen, daß der Arsenwasserstoff an den Zellen eine ganz bestimmte Veränderung setzt.

c) Übermikroskopische Ergebnisse. Die übermikroskopischen Untersuchungen wurden mit dem von B. v. BORRIES und E. RUSKA entwickelten Instrument vorgenommen. Methodische Einzelheiten wurden in den vorhergehenden Arbeiten geschildert. Zur Kontrolle wurden laufend Zellen von unbehandelten Blutproben dargestellt. Solche Kontrollen sind zur Vermeidung von Fehldeutungen notwendig, da mitunter in gesundem Blut Zellen mit nicht vollständig wasserlöslichem Hämoglobin vorhanden sind.

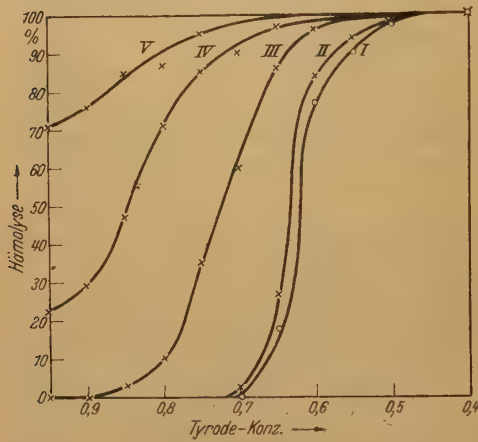


Abb. 1. Osmotische Resistenz menschlicher Blutkörperchen, die in Tyrode aufgeschwemmt, 30 Sek. mit AsH_3 behandelt wurden. I. Kontrolle; II. sofort; III. nach 30 Min.; IV. nach 60 Minuten; V. nach 340 Min. Ordinate: % Hämolyse; Abszisse: Tyrode Konzentration im logarithmischen Maßstab (Isotonie: 1).

Sofort nach Einwirken des Arsenwasserstoffs isolierte Membranen zeigen eine sehr deutliche Strukturierung, welche im unfixierten Zustand unverkennbar und nach Osmiumfixation sehr auffallend ist. Bei sehr starker Vergrößerung lassen sich in der Membran viele kleine Löcher darstellen, welche etwa einen Durchmesser von 3mal 10^{-4} cm besitzen. Im unfixierten Präparat finden sich zahlreiche feinste Körnchen auf der Zellmembran, welche einen starken Kontrast geben. Es handelt sich möglicherweise um kolloides Arsen, das unter den Versuchsbedingungen in sehr feiner Verteilung entstanden sein mag. Die Teilchen lassen sich auch im fixierten Präparat noch nachweisen, vgl. hierzu Abb. 2 u. 3.

Werden die Stromata erst bei beginnender Hämolyse präpariert, so zeigen die Zellen kein einheitliches Bild mehr. Sowohl in den Darstellungen fixierter wie unfixierter Zellen lassen sich Ausfällungen von Hämoglobin in sehr wechselnden Mengen nachweisen. Daneben ist die Strukturierung der Membran sehr deutlich, auch die feinen staubartigen Körnchen sind in zahlreichen Zellen noch nachweisbar. Erfolgt die Präparation erst nach 24 Stunden, d. h. nach eingetretener Totalhämolyse, so ist die Ausfällung des Hämoglobins noch ausgesprochener, und bei vielen Zellen ist zwischen den Hämoglobinkoagula nicht mehr viel von der zerstörten Membran zu sehen (Abb. 4—7).

Wesentlich größere Mengen Koagula bleiben in den Zellen liegen, wenn mit dem Arsenwasserstoff zusammen Sauerstoff eingeleitet wird. Unter

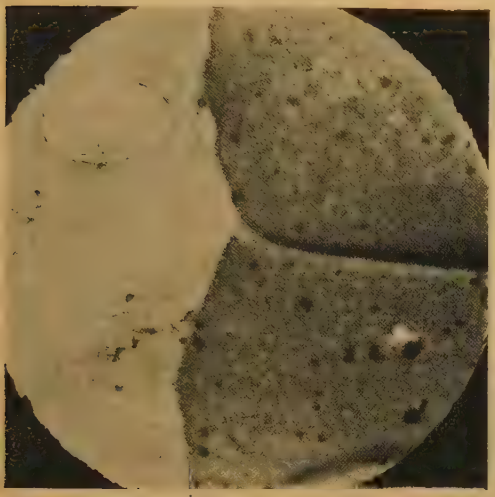


Abb. 2. Unfixierte Membran. Zelle kurz mit AsH_3 behandelt und sofort präpariert. Vergr. 9700×.

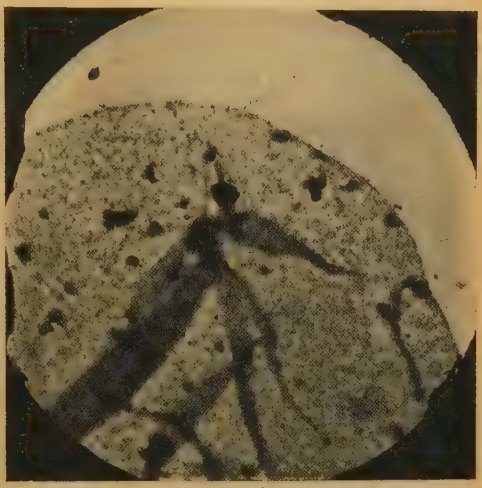


Abb. 3. Fixierte Membran, sonst wie Abb. 2. Vergr. 9700×.

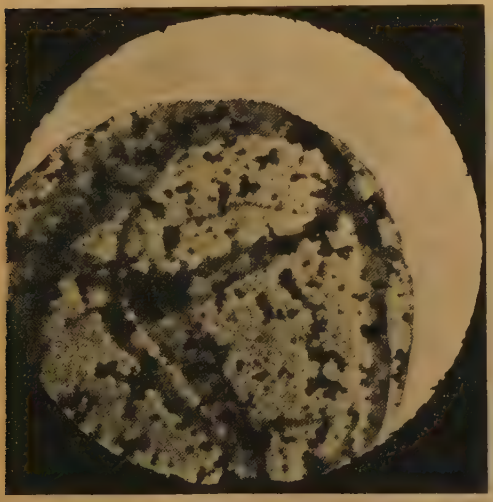


Abb. 4. Fixierte Membran. Zelle kurz mit AsH_3 (20 Sek.) behandelt, 24 Stunden später präpariert. Vergr. 7200×.

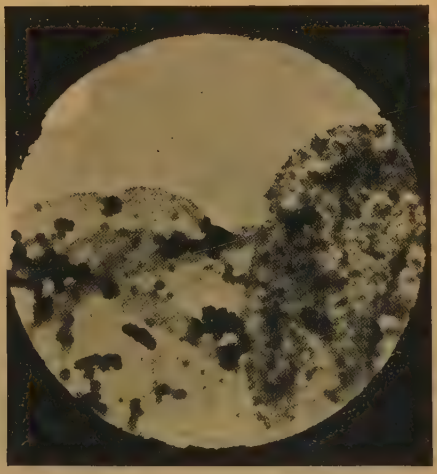


Abb. 5. Fixierte Membran. Zelle mit AsH_3 (10 Min.) behandelt, nach Eintritt der Totalhämolyse präpariert. Vergr. 6700×.

Umständen kann dann im Präparat auch Hämoglobin außerhalb der Zellen ausgefällt werden. Die entstehenden Bilder entsprechen etwa den Befunden, welche als Endstadien nach Hitze, Sublimat, aber auch nach Phenylhydrazin und Phenylendiamineinwirkung gesehen wurden (Abb. 8).

d) Chemische Veränderungen der Membran. Die Membranen arsenwasserstoffbehandelter Zellen zeigen neben den geschilderten funktionellen und

Abb. 6. Fixierte Membran nach Eintritt der Totalhämolyse. Vergr. 8000×.

Abb. 7. Fixierte Membran, starke Schrumpfung. Vergr. 9700×.

morphologischen Veränderungen auch ein auffallend starkes Reduktionsvermögen gegenüber Osmiumtetroxyd. Während normale Membranen bei der Osmiumfixation sich lediglich schwach bräunlich verfärben, ergeben AsH_3-behandelte Membranen einen dicken schwarzen Niederschlag, der sehr schnell sedimentiert, so daß man versucht wäre, ihn für einen Osmiumniederschlag zu halten. Mikroskopisch enthält der Niederschlag ausschließlich Membranen. Diese Eigenschaft geht bei mehrmaligem Waschen mit destilliertem Wasser nicht verloren, kann also nicht auf anhaftenden AsH_3 zurückgeführt werden.

Abb. 8. Fixierte Membran; Zelle nach 10 Min. Einwirken von $AsH_3 + O_2$. Beachte koaguliertes Hb, sowie die Schrumpfung des Stromas. Vergr. 17000×.

III. Versuche in vivo.

In einigen Katzenversuchen sollten die entsprechenden Verhältnisse in vivo untersucht werden. Die Vergiftung der Tiere erfolgte innerhalb einer Gaskammer.

a) Akute Vergiftung. Zwei Tiere erhielten eine kräftige akute Vergiftung, in deren Verlauf sie infolge Anoxämie starben. Der Tod trat nach

45 Min. ein, sofort anschließend wurde Blut durch Herzpunktion entnommen. Es war bereits Hämolyse eingetreten. In der kräftig braun gefärbten Blutprobe befanden sich überhaupt keine normalen Zellen mehr, sondern alle Erythrozyten waren gleichmäßig geschädigt. Das Auftreten grüner Hämoglobinderivate konnte aus der Farbe des Blutes vermutet werden.

b) Subakute Vergiftung. Zwei weitere Tiere erhielten eine etwas geringere Arsenwasserstoffdosis, an deren Folgen sie im Verlauf von 4—6 Stunden zugrunde gingen. Unmittelbar nach Versuchsbeendigung zeigten die hellroten Blutzellen keine Spur von Zerfall. Die Hämolyse trat erst innerhalb der nächsten Stunde auf, beim Tode der Tiere war sie ganz ausgesprochen. Eine Veränderung der Stromata war übermikroskopisch bereits nach 45 Min. nachweisbar, sie wurden farbstoffreicher und zeigten ausgesprochene Zerstörungen der Membranstruktur. In sehr vielen Präparaten waren wegen der leichten Zerstörbarkeit der Zellen schließlich nur noch undefinierte Zerfallsprodukte zu sehen. Die Ausfällung des Hämoglobins war zum Teil sehr massiv (Abb. 9 u. 10). Nach dem Tod der Tiere war das Bild dasselbe.

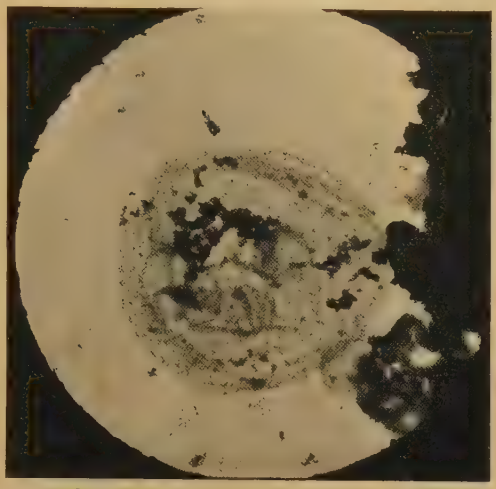


Abb. 9. Fixierte Membran. Zelle einer Katze, 7 Stunden nach Vergiftung mit Arsenwasserstoff präpariert. Vergr. 9400×.

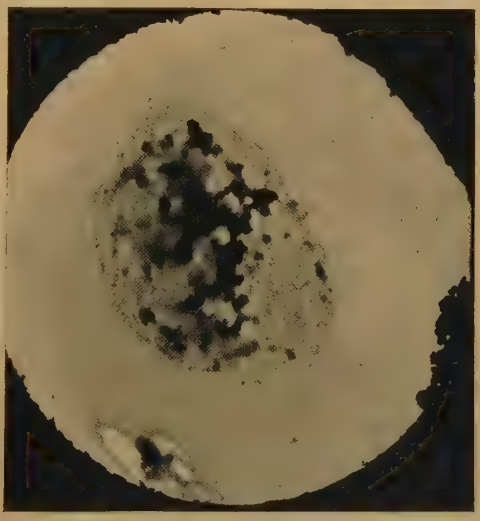


Abb. 10. Fixierte Membran. Vergr. 9400×.

IV. Besprechung.

Eine sehr eingehende Untersuchung der chronischen Arsenwasserstoffvergiftung am Hund stammt von Kiese[5]. Eigentümlicherweise berichtet

er nichts über die Bildung toxisch geschädigter Erythrozyten, dafür kommen die Änderungen der Erythrozytenresistenz in seinen Kurven sehr deutlich heraus. Es fällt nun bei Betrachtung seiner Befunde auf, daß bei einem großen Teil seiner Kurven (vgl. Abb. 1—5) die Abnahme der osmotischen Resistenz und die Retikulozytenzahl sich gleichsinnig verhalten. Die beobachteten Retikulozytenwerte sind ferner ganz außerordentlich hoch (10 bis 72%), außerdem treten die Anstiege — namentlich bei den Vergiftungen mit den höheren Dosen fast gleichzeitig mit der Resistenzabnahme und dem Sturz der Gesamtzahl der Erythrozyten auf. Da wir nun in unseren Untersuchungen über toxische Veränderungen der roten Blutkörperchen wiederholt pathologische Erscheinungen an den Zellen beobachten konnten, die lichtoptisch nach Vitalfärbung durchaus wie Retikulozyten wirkten und da wir ferner nachweisen konnten, daß verschiedene Autoren (etwa bei der Phenylhydrazin-, Toluylendiamin- und Pyrogallolvergiftung) diese Veränderung) als Retikulozyten registrierten, müssen wir annehmen, daß mindestens bei einem Teil der von Kiese beobachteten Zellen geschädigte Zellen und keine unreifen Formen vorliegen. Bei Brillantkresylblaufärbung geben tatsächlich die oben bei elektronenoptischer Vergrößerung gezeigten Zellen ein lichtoptisches Bild, das sehr an Retikulozyten erinnert.

Akute Arsenwasserstoffvergiftungen an Tieren hat Lendle[6] untersucht, mit dessen Methodik und Hilfe die obenbeschriebenen Tierversuche durchgeführt wurden. Bei den vergifteten Katzen trat keine Spur einer Retikulozytenausschüttung, vielmehr ausschließlich die beschriebene Erythrozytenstörung auf.

Beide Versuchsreihen bestätigen die schon lange bekannte Tatsache, daß die Hämolyse (neben der Hämiglobinbildung bei der akuten Vergiftung) im Mittelpunkt des Vergiftungsbildes steht. Die alte von Labes vertretene Ansicht kann aber weder den unmittelbaren Hämolysemechanismus noch das Auftreten der elektronenoptisch oder durch Vitalfärbung darstellbaren Erythrozytenveränderungen verständlich machen. Die obigen Befunde tragen jedoch alle zur Stützung der eingangs angedeuteten Hypothese einer Hämolyse durch oxydative Denaturierung der Erythrozytenmembran bei: Zunächst läßt sich lichtoptisch wie auch im Reagenzglas feststellen, daß bei der Umsetzung des Arsenwasserstoffs mit Hämoglobin bzw. Blutkörperchen Eiweißausfällungsprozesse regelmäßig vorkommen. Es besteht keine Veranlassung zu der Annahme, daß diese Denaturierung vor dem an sich sehr empfindlichen und schon in destilliertem Wasser schnell denaturierenden Stromaeiweiß Halt macht und lediglich das Hämoglobin trifft. Man kann somit ohne jede Voraussetzung schon aus dem Versuch mit Hämoglobinlösungen in vitro schließen, daß Arsenwasserstoff in vitro hämolysieren muß. Wie die Abbildungen zeigen, läßt sich der Ablauf der Denaturierungsvorgänge an der Zelle verfolgen und es lassen sich je nach dem Ausmaß der Hämoglobinausfällung einzelne Stadien festhalten. Sehr

bezeichnend ist nun, daß die Zellmembranen nach Arsenwasserstoffeinwirkung schon bei Konzentrationen, die noch zu keiner sichtbaren Ausfällung des Hämoglobins führen, eine deutliche Strukturierung zeigen. Es ist anzunehmen, daß diese Strukturierung der morphologische Ausdruck für die geringgradige Permeabilitätssteigerung ist, welche zur Ursache der obenbeschriebenen Schwellungshämolyse wird. Auf eine Änderung der Stromastruktur läßt auch die veränderte Reaktionsweise der isolierten Stromata nach Arsenwasserstoffeinwirkung mit Osmiumtetroxyd schließen.

Kleinste Arsenwasserstoffmengen führen also zu einer geringgradigen Strukturänderung der Membran, deren Folge eine Permeabilitätsänderung und eine Schwellungshämolyse ist. Bei etwas größeren Arsenwasserstoffmengen kommt auch zunehmend Hämoglobin im Verlauf von einigen Stunden innerhalb der Zelle zur Ausfällung. Die isolierten Stromata sind daher um so farbstoffreicher, je später man sie nach einem Versuch aus der Blutprobe isoliert. Bei noch höheren Arsenwasserstoffkonzentrationen treten die Ausfällungen des Farbstoffes und die grob morphologischen Zerstörungen mehr und mehr in den Vordergrund, bis schließlich die Zellen (vgl. Tabelle 2) gar nicht mehr hämolysierbar erscheinen, obwohl sie vollständig zerstört sind. Die einzelnen Stadien der Einwirkung des Arsenwasserstoffes lassen sich nicht nur an den Erythrozytenveränderungen und den Eiweißausfällungen, sondern auch an den sonstigen chemischen Veränderungen des Hämoglobins registrieren (Hämiglobin- und Verdoglobinbildung).

Arsenwasserstoff ist im allgemeinen eine ziemlich reaktionsträge Substanz, er zerfällt erst in Gegenwart bestimmter Katalysatoren. Aus diesem Grund ist er auch bei der Einatmung völlig reiz- und im reinen Zustand auch geruchlos. Im Serum ist er löslich, wird aber nicht weiter umgesetzt. Daraus folgt also, daß der Arsenwasserstoff sich bis zu seinem Eintritt ins Blut wie ein indifferentes Gas verhält und daß sich sein Verhalten erst dann grundlegend ändert, wenn er ins Innere der Erythrozyten gelangt. Erst dort setzt die genannte gekoppelte Oxydation ein und führt zu dem beschriebenen Bild. Da bei den Versuchen in vivo die geschädigten Erythrozyten nicht wesentlich anders erscheinen als bei den Versuchen in vitro und da in beiden Fällen auch der zeitliche Ablauf der hämolytischen Prozesse etwa derselbe ist, müssen sich jeweils dieselben Vorgänge im Erythrozyten abspielen. — Die spezifische Blutgiftwirkung des Arsenwasserstoffs läßt sich also in jeder Einzelheit aus seinem chemischen und physikochemischen Verhalten ableiten.

Zusammenfassung.

Eine hämolytische Wirkung von Arsensolen konnte nicht nachgewiesen werden.

Die hämolytische Wirkung des Arsenwasserstoffs wurde an isolierten menschlichen Blutzellen und an der Katze untersucht. Sie ist nicht auf eine Wirkung kolloiden Arsens, sondern auf die Umsetzung des Arsenwasserstoffs in der Blutzelle zurückzuführen. Als Nebenreaktion der gekoppelten Oxydation des Arsenwasserstoffs kommt es zu Denaturierungsvorgängen am Membraneiweiß. Diese Veränderungen der Blutkörperchenmembranen lassen sich unmittelbar nach der Behandlung mit Arsenwasserstoff an der Struktur im übermikroskopischen Bild feststellen.

Die Heinzschen Körperchen, welche man bei der Arsenwasserstoffvergiftung beobachtet hat, sind Hämoglobinausfällungen im Inneren der Zelle, die bei intensiven Arsenwasserstoffeinwirkungen auftreten und die ebenfalls Folge der Denaturierungsprozesse im Laufe der gekoppelten Oxydation sind.

Literatur.

[1] Labes, L.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **124**, 126 (1927). — [2] Henze: Klin. Wschr. **1938 I**, 24. — [3] Jung, F.: Biochem. Z. **302**, 294 (1939). — [4] Wilbrandt, W.: Pflügers Arch. **245**, 22 (1941). — [5] Kiese, M.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **186**, 337 (1934). — [6] Lendle, L.: Unveröffentlichte Versuche.

Über die Kreislaufwirkung des Peripherins*.

I. Mitteilung.

Von

R. Knebel**.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. Februar 1947.)

Seit der Darstellung des Ephedrins aus Ephedra vulgaris führten Chen[1] und seine Mitarbeiter die blutdrucksteigernde Wirkung dieses Alkaloids, dessen nahe Verwandtschaft zum Adrenalin sie nachgewiesen hatten, auf eine Erhöhung des Minutenvolumens zurück. Hierbei wurde eine reine Herzwirkung angenommen. Am isolierten Warmblüterherzen konnten Rühl[2] und Kiese, Garan und Krautwald[3] mit Ephedrin auch eine Förderung der mechanischen Leistung des Herzmuskels nachweisen. Am Ganztier jedoch fanden Halsey[4], Trendelenburg[5], Rühl[2], Wezler und Thauer[6] u. a. während der Dauer der Blutdruckwirkung eine nicht unbedeutende Herabsetzung des Schlag- und Minutenvolumens. Die Abnahme des Minutenvolumens bei Zunahme der peripheren Widerstände wurde als unerwünschte Zusatzbelastung des Herzmuskels aufgefaßt. Auch am Menschen konnten von Böger, Deppe und Wezler[7] und Wezler und Thauer[6] bei intravenösen Ephedringaben, insbesondere nach höherer Dosierung, eine starke und nachhaltende Senkung des Minutenvolumens bei Steigerung der peripheren Widerstände nachgewiesen werden, während Euler und Liljestrand[8] und Nogarede[9] mit anderer Methodik eine Steigerung des Minutenvolumens beobachten.

Durch Kombination des Ephedrins mit Theophyllin gelang es Wezler und Thauer[6] bei intravenöser Gabe des Präparates am Tier und Mensch die unerwünschte Senkung des Minutenvolumens auszuschalten und eine langanhaltende Steigerung des Blutdruckes zu erzielen, die im wesentlichen durch eine beträchtliche Zunahme des Schlag- und Minutenvolumens bedingt war.

Wir haben am Menschen die Kreislaufwirkung der Kombination von Ephedrin mit Theophyllin (= *Peripherin*) nachuntersucht und hierbei

---

* Die Arbeit wurde in der II. Medizinischen Klinik der ehemaligen Deutschen Karls-Universität in Prag (Direktor: Prof. Dr. A. Rühl) und der Chirurgischen Klinik der ehemaligen Deutschen Karls-Universität in Prag (Direktor: Prof. Dr. J. Hohlbaum †) ausgeführt.

** Unter Mitarbeit von H. Krüger-Martius.

insbesondere die Wirkung intravenöser und intramuskulärer Injektionen des Präparats miteinander verglichen. Außerdem erweiterten wir die Untersuchungen auf die Wirkung bei akuten und chronischen Kollapszuständen. In der hier vorliegenden I. Mitteilung berichten wir zunächst über unsere Ergebnisse bei normalen Kreislaufverhältnissen.

Methodik.

Folgende Kreislaufgrößen wurden an der Versuchsperson in bestimmten Zeitabschnitten gemessen:

Nach dem Verfahren von Korotkoff:

1. systolischer Blutdruck (P_s),
2. diastolischer Blutdruck (P_d),
3. Pulsdruckamplitude (ΔP),
4. arterieller Mitteldruck (P_m) = diastolischer Blutdruck + 42% der Pulsdruckamplitude.

Nach den physikalischen bzw. sphygmographischen Methoden von O. Frank in der Anwendung von Wezler und Böger[11]:

5. Pulsfrequenz (Fr),
6. Schlagvolumen (V_s),
7. Minutenvolumen (V_m),
8. elastischer Widerstand der Aorta (E'),
9. peripherer Strömungswiderstand (W).

Alle Versuche wurden morgens nüchtern am liegenden Menschen durchgeführt. Das uns zur Verfügung gestellte Präparat 704/II (= Peripherin*) enthielt laut Angabe der Firma in 2 ccm 0,175 Theophyllin-Ephedrin und 0,6 Theophyllin-Diäthanolamin. In 1 ccm sind demnach 0,2 Theophyllin, 0,0375 Ephedrin und 0,15 Diäthanolamin enthalten.

Versuchsergebnisse.

Wir berichten zunächst über unsere Versuchsergebnisse mit *Peripherin* an kreislaufgesunden männlichen Personen bei *intravenöser* Injektion. Als Dosis wählten wir in allen Fällen 1 ccm, um die Resultate an verschiedenen Personen miteinander vergleichen zu können.

Als Beispiel der Kreislaufwirkung nach einmaliger i.v. Injektion bringen wir in der Abb. 1 die Kurven eines Versuches bei einem 19jährigen Mann, der wegen einer bereits abgeklungenen akuten Polyarthritis rheumatica in klinischer Behandlung stand. In diesem Versuch kommt die langanhaltende Kreislaufwirkung nach einmaliger i.v. Injektion von Peripherin sehr eindrucksvoll zum Ausdruck; es konnte hier eine Blutdrucksteigerung von über 8 Stunden Dauer erzielt werden. 11 Min. nach der Injektion ist das Maximum der Blutdruckwirkung erreicht. Der systolische Blutdruck (P_s) nimmt von 119 auf 180 mm Hg zu, d. h. um +51%. Der diastolische Blutdruck (P_d) verringert sich hierbei von 66 auf 48 mm Hg, d. i. um −27%. Dementsprechend steigt die Druckamplitude (ΔP) von 56 auf 132 mm Hg an, d. h. um +136%. Im weiteren Verlauf nimmt der systolische Blutdruck allmählich ab;

* Chemiewerke Homburg AG.

nach 8 Stunden liegt er jedoch immer noch über dem Ausgangswert. Der diastolische Blutdruck erreicht etwa nach einer halben Stunde wieder den Ausgangswert; im weiteren Verlauf bleibt er praktisch konstant. Die Pulsfrequenz (Fr) bleibt im Maximum der Wirkung konstant; in der 2. Stunde nach der Injektion steigt sie vorübergehend an. Die erhebliche Zunahme der Druckamplitude ist während der

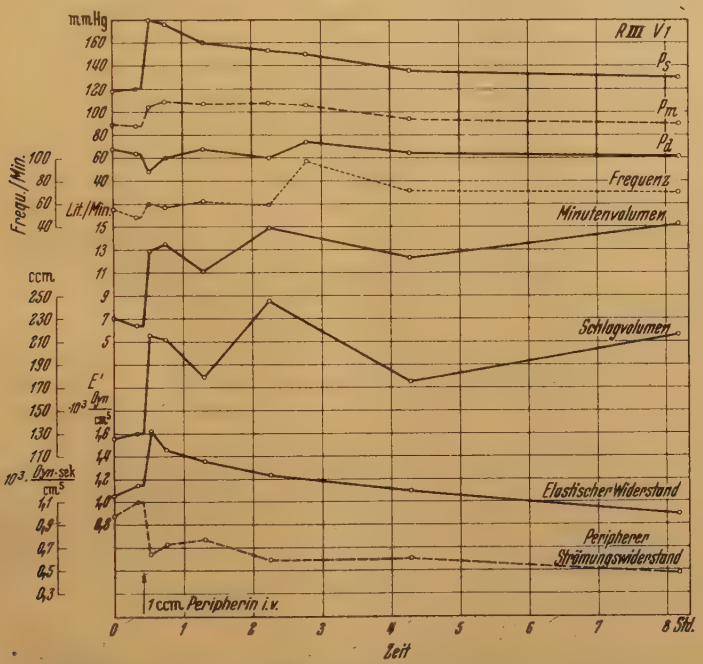


Abb. 1. Peripherinversuch (1 ccm intravenös); 19jähriger, kreislaufgesunder Mann, Gewicht 75 kg (V. 1): P_s systolischer Blutdruck, P_m Mitteldruck, P_d diastolischer Blutdruck (s. Text).

gesamten Dauer der Blutdrucksteigerung im wesentlichen durch das Ansteigen des Schlagvolumens bedingt, wie aus den Analysenwerten hervorgeht. Das Schlagvolumen mit einem relativ hohen Ausgangswert von 128 ccm erfährt im Maximum der Wirkung eine Zunahme von + 69%. Zum Teil ist jedoch, namentlich zu Beginn der Kreislaufreaktion, das Ansteigen der Druckamplitude auch von der Zunahme des elastischen Widerstandes (E') abhängig, welcher maximal um + 42% ansteigt. Das Minutenvolumen nimmt im Maximum der Wirkung um + 91% zu; im übrigen läuft es dem Schlagvolumen parallel. Der periphere Strömungswiderstand nimmt während der Dauer der Blutdrucksteigerung ab, im Maximum der Blutdruckwirkung um —42%.

Wie in dem Beispiel der Abb. 1 konnte bei vier weiteren kreislaufgesunden Versuchspersonen verschiedener Lebensalter nach intravenöser

Tabelle 1. *Prozentuale Veränderung der einzelnen Kreislaufgrößen bei maximaler Blutdrucksteigerung nach jeweils 1 ccm Peripherin intravenös bei 5 kreislaufgesunden Versuchspersonen.*

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Versuchsnummer	Alter	Wirkungsdauer Min.	Systolischer Blutdruck P_s mm Hg	Prozentuale Veränderung ΔP_s %	Diastolischer Blutdruck P_d mm Hg	Prozentuale Veränderung ΔP_d %	Pulsfrequenz Fr	Schlagvolumen V_s ccm	Prozentuale Veränderung ΔV_s %	Minutenvolumen V_m Liter/Min.	Prozentuale Veränderung ΔV_m %	Peripherer Widerstand $W \cdot 10^3$ Dyn./sec / cm⁵	Prozentuale Veränderung ΔW %	Elastischer Widerstand $E' \cdot 10^3$ Dyn. / cm⁵	Prozentuale Veränderung $\Delta E'$ %
R III V. 1	19	480	119 > 180	+ 51,0	66 > 48	— 27,2	49 60	127,9 > 215,8	+ 68,5	6,75 > 12,89	+ 91,2	1,100 > 0,643	— 41,6	1,15 > 1,63	+ 42,0
V. 2	35	180	114 > 150	+ 31,5	74 > 70	— 5,4	54 51	81,2 > 138,0	+ 69,8	4,37 > 7,00	+ 60,0	1,670 > 1,134	— 32,2	1,32 > 1,55	+ 17,6
V. 8	26	120	122 > 174	+ 42,6	74 > 80	+ 8,1	82 70	73,6 > 119,0	+ 61,5	5,95 > 8,38	+ 40,8	1,271 > 1,142	— 10,8	1,75 > 2,11	+ 20,6
V. 25	38	180	114 > 160	+ 40,3	74 > 90	+ 21,3	63 91	70,2 > 84,3	+ 20,1	4,45 > 7,05	+ 26,0	1,66 > 1,53	— 7,8	0,52 > 2,41	+ 58,5
V. 27	39	90	106 > 160	+ 49,3	75 > 82	+ 9,3	54 67	43,7 > 93,8	+ 50,1	2,36 > 6,25	+ 164,9	2,98 > 1,47	— 50,7	1,90 > 2,22	+ 11,6
		Mittelwert		+ 43,0		+ 1,2			+ 54,0		+ 76,6		— 28,6		+ 30,1

Injektion eine langanhaltende Blutdrucksteigerung durch Zunahme des Minutenvolumens erzielt werden. Die Wirkungsdauer sowie die prozentualen Veränderungen der einzelnen Kreislaufgrößen bei maximalem Blutdruckanstieg sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Im einzelnen betrug die Dauer der Blutdrucksteigerung bei der gewählten Dosierung von 1 ccm *Peripherin*, abgesehen von dem beschriebenen Versuch mit über 8 Stunden Dauer, bei zwei Versuchspersonen je 3 Stunden, in einem Fall 2 Stunden und schließlich bei einer weiteren Person 1 Stunde und 30 Min.

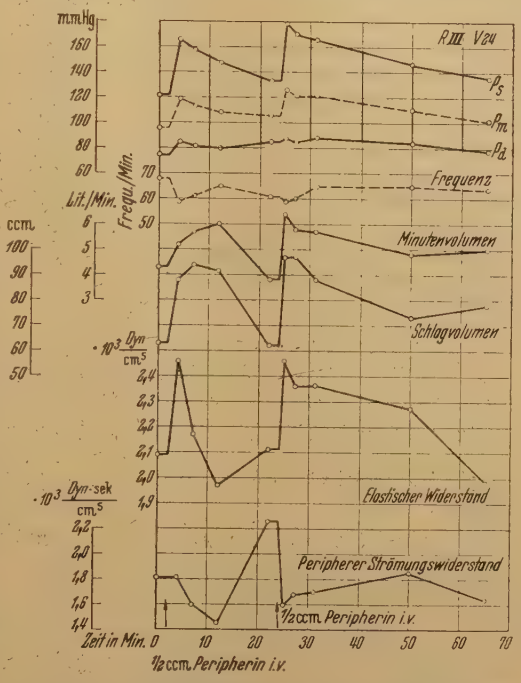


Abb. 2. Wiederholte intravenöse Injektion von 0,5 ccm Peripherin; 38jähriger, kreislaufgesunder Mann; Gewicht 54 kg (V. 24): P_s systolischer Blutdruck, P_m Mitteldruck, P_d diastolischer Blutdruck (s. Text).

Ein Blick auf die Tabelle zeigt, daß der Wirkungsmechanismus im Prinzip bei allen Kreislaufversuchen derselbe ist. Er entspricht dem in der Abb. 1 dargestellten Versuch. Der Einfluß auf den diastolischen Blutdruck (P_d) ist nur gering und etwas wechselnd; dagegen ist der Einfluß auf den systolischen Blutdruck (P_s) erheblich; die Zunahme beträgt im Mittel + 43%. Im Vordergrund der Blutdruckwirkung steht demnach die Zunahme der Druckamplitude bei nur geringer Beeinflussung des diastolischen Blutdrucks. Der Hauptanteil des Amplitudenanstiegs wird von der Zunahme des Schlagvolumens (V_s) mit einem mittleren Anstieg von + 54% im Maximum getragen, während die maximale Zunahme des elastischen Widerstandes (E') im Mittel + 34% beträgt. Der Einfluß auf die Pulsfrequenz ist nur gering, wie aus der Spalte 8 der Tabelle hervorgeht. Das Minutenvolumen nimmt im Mittel etwa um + 77% zu, während der periphere Gesamtwiderstand um etwa — 29% abnimmt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich bei kreislaufgesunden Versuchspersonen mit i.v. Injektion von 1 ccm *Peripherin* eine über Stunden anhaltende Blutdrucksteigerung auslösen läßt; die Blutdrucksteigerung beruht im wesentlichen auf einer Zunahme des Schlag- bzw. Minutenvolumens, wobei die Pulsfrequenz keine wesentliche Änderung erfährt.

Bei rascher Wiederholung einer intravenösen Ephedringabe wird im Tierversuch eine Abschwächung der Blutdrucksteigerung beobachtet (Rudolf und

GRAHAM[10]). Diese Wirkungsabschwächung wird als Tachyphylaxie bezeichnet. Wir haben deshalb untersucht, ob sich vielleicht am Menschen mit der Theophyllin-Ephedrinverbindung *Peripherin* eine Tachyphylaxie feststellen ließe. In dem Beispiel der Abb. 2 wurde einem 36jährigen Ulcuskranken in einem Abstand von 20 Min. jeweils 0,5 ccm *Peripherin* intravenös injiziert. Bei dieser Dosierung beträgt die Dauer der Blutdrucksteigerung etwa 20 Min., wobei die für intravenöse Injektion typische Kreislaufreaktion mit Erhöhung des Schlag- und Minutenvolumens zu beobachten ist. Nach der zweiten Injektion nimmt der systolische Blutdruck ebenfalls wie nach der ersten um 44 mm Hg zu. Auch der Anstieg des diastolischen und mittleren Blutdrucks ist nach der wiederholten Injektion annähernd der gleiche. Ein Blick auf die Kurven der Abbildung zeigt, daß die einzelnen Kreislaufgrößen nach der zweiten Injektion den gleichen Reaktionsverlauf aufweisen wie nach der ersten und keine Wirkungsabschwächung oder -umkehr zu beobachten ist. Am Menschen läßt sich somit mit *Peripherin* keine Tachyphylaxie nachweisen.

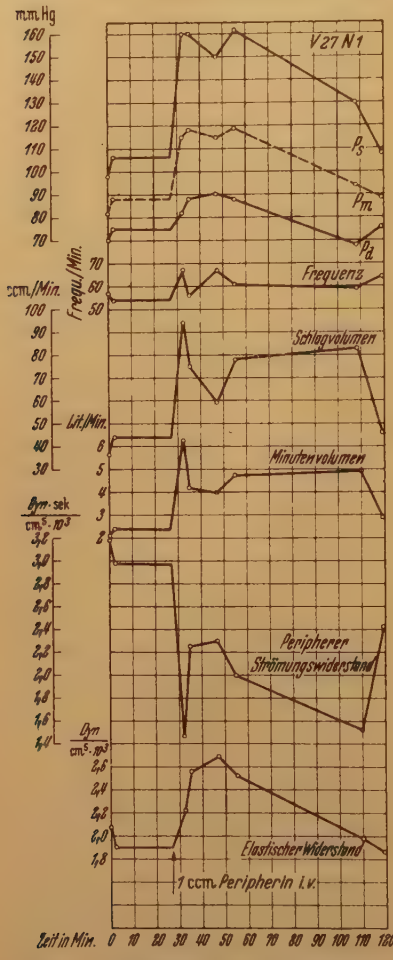


Abb. 3. Peripherinversuch (1 ccm intravenös); 39jähriger, kreislaufgesunder Mann, Gewicht 61,3 kg (V. 27 N 1): P_s systolischer Blutdruck, P_m Mitteldruck, P_d diastolischer Blutdruck (s. Text).

Es wurde nun von uns der Versuch unternommen, die Kreislaufwirkung des *Peripherins* nach intravenöser und intramuskulärer Injektion miteinander zu vergleichen. Die Untersuchungen wurden jeweils an derselben Versuchsperson an verschiedenen Tagen ausgeführt und auch hier 1 ccm *Peripherin* i.v. oder i.m. verabreicht. Lokale Reizerscheinungen wurden bei den intramuskulären Injektionen nicht beobachtet. Subjektiv wurden bei beiden Injektionsformen nur günstige Wirkungen empfunden, wie sie auch von WEZLER und THAUER[6] beschrieben worden sind.

Es ergab sich, daß unter normalen Kreislaufverhältnissen *nach intravenöser und intramuskulärer Injektion eine voneinander grundsätzlich verschiedene Reaktion* auf den Verlauf der Blutdruckwerte und dementsprechend auf die einzelnen Kreislaufgrößen festzustellen ist. Wir stellen als Beispiel die nach i.v. und i.m. Injektion von *Peripherin*

gewonnenen Kurven in den Abb. 3 und 4 nebeneinander. Sie stammen von einem 39jährigen, kreislaufgesunden Mann, der wegen eines Ulcus ventriculi in klinischer Behandlung stand. In Abb. 3 sehen wir den oben beschriebenen typischen Reaktionsablauf nach i.v. Injektion mit einer Wirkungsdauer von etwa 1 Stunde und 30 Min.; das Maximum der Blutdrucksteigerung ist bereits nach wenigen Minuten erreicht. In

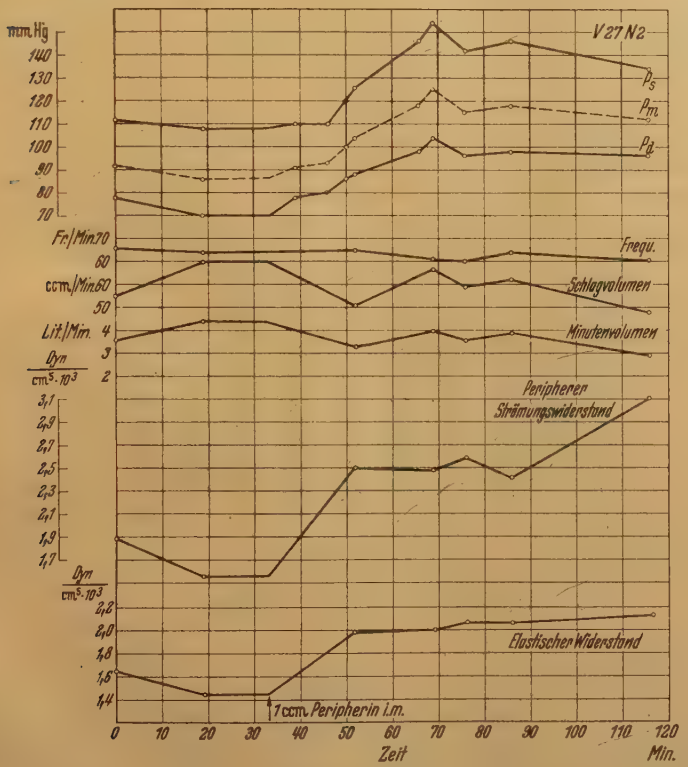


Abb. 4. Peripherinversuch (1 ccm intramuskulär) (V. 27 N 2); dieselbe Versuchsperson wie in Abb. 3 (s. Text).

den Kurven der Abb. 4 ist die Kreislaufreaktion nach i.m. Injektion dargestellt. Man ersieht, daß nach 1 Stunde und 30 Min. der Blutdruck noch erhöht ist und daß das Maximum der Blutdrucksteigerung hier erst nach 40 Min. erreicht wird. Der wesentliche Unterschied bei beiden Injektionsformen liegt im Verhalten des diastolischen Druckes und der Druckamplitude; und zwar steigt bei i.m. Injektion der diastolische Blutdruck erheblich stärker an als bei intravenöser. Andererseits wird die relativ geringe Zunahme der Druckamplitude nach i.m. Injektion hier nicht wie bei der intravenösen durch Zunahme des Schlagvolumens hervorgerufen, sondern ist ausschließlich auf das Ansteigen des elastischen Widerstandes zurückzuführen. Nach geringer initialer Senkung

erreicht das Schlagvolumen während des Maximums der Blutdrucksteigerung wieder den Ausgangswert. Die Schwankungen des Schlagvolumens sind jedoch unerheblich und im Bereich der Ruhewerte. Ebenfalls ist eine geringe Abnahme der Pulsfrequenz zu verzeichnen, während bei i.v. Injektion die Herzfrequenz etwas zunimmt. Das Minutenvolumen läuft den Schwankungen des Schlagvolumens parallel. Das Schlag- und Minutenvolumen wird also bei i.m. Injektion nur wenig beeinflußt. Der Zunahme des diastolischen Druckes entsprechend, steigt bei i.m. Injektion der periphere Strömungswiderstand erheblich an.

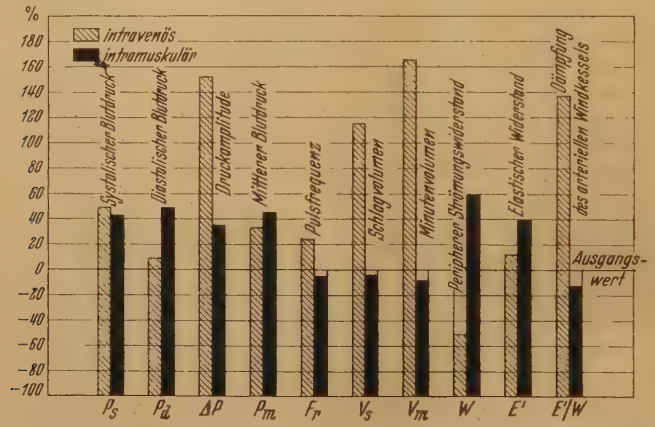


Abb. 5. Zum Vergleich der grundsätzlich verschiedenen Kreislaufwirkung von 1 ccm Peripherin nach intravenöser und intramuskulärer Injektion. Prozentuale Veränderung der einzelnen Kreislaufgrößen im Maximum der Blutdrucksteigerung. 39jähriger, kreislaufgesunder Mann; Gewicht 61,3 kg (V. 27 N 1 und N 2).

In dem Säulendiagramm der Abb. 5 haben wir die prozentualen Veränderungen der einzelnen Kreislaufgrößen bei maximaler Blutdrucksteigerung nach i.v. und i.m. Injektion eingezeichnet. Im einzelnen ergibt sich, daß der prozentuale Anstieg des systolischen Blutdrucks auf + 49 bzw. + 43% nach i.v. und i.m. Injektion annähernd gleich ist, während der diastolische Druck i.v. um + 9% i.m. dagegen um + 49% ansteigt; entsprechend steigt die Druckamplitude i.v. um + 152%, i.m. nur um + 25% an. Intravenös erfolgt eine mäßige Zunahme der Pulsfrequenz, intramuskulär eine geringe Abnahme. Eindrucksvoll ist das verschiedene Verhalten des Schlag- bzw. Minutenvolumens. Intravenös steigt das Schlagvolumen um + 115%, das Minutenvolumen sogar um + 165% an, während intramuskulär das Schlag- und Minutenvolumen im Maximum der Blutdruckwirkung geringgradig abnimmt. Demzufolge nimmt der periphere Strömungswiderstand i.v. um — 51% ab, dagegen i.m. um + 59% zu. Das Ansteigen der Druckamplitude bei i.m. Injektion ist durch das prozentual annähernd gleich hohe Anwachsen des elastischen Widerstandes bedingt. Das Verhältnis E'/W, nach WEZLER und BÖGER[11] ein Maß für die Dämpfung des arteriellen Systems, nimmt nach i.v. Injektion um 137% zu; nach i.m. Injektion ist eine Abnahme von — 13% zu verzeichnen.

Aus der Gegenüberstellung der prozentualen Veränderungen der einzelnen Kreislaufgrößen bei maximaler Blutdrucksteigerung kommt

die verschiedene Wirkung bei intravenöser und intramuskulärer Injektion gut zum Ausdruck; bei etwa gleich hohem Ansteigen des mittleren arteriellen Blutdrucks wird *intravenös* mit *Peripherin* eine langanhaltende

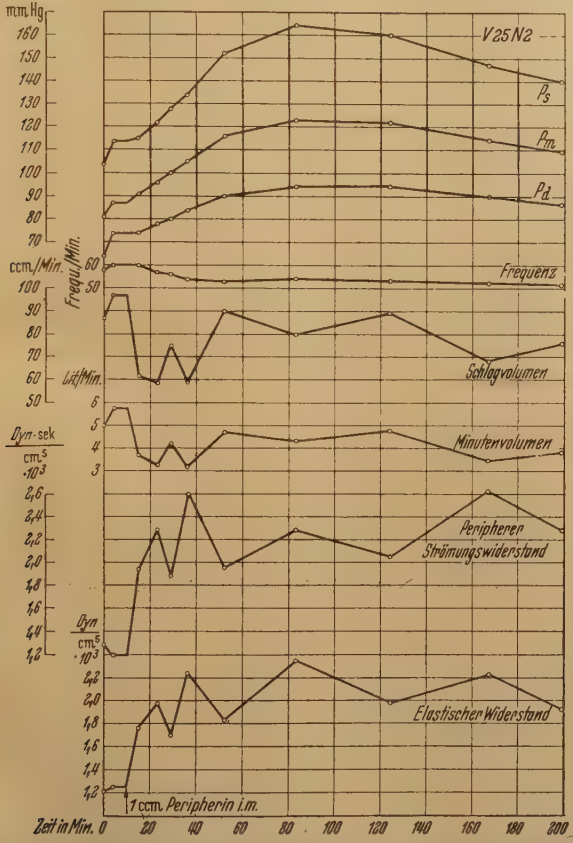


Abb. 6. Peripherinversuch (1 ccm intramuskulär); 38jähriger, kreislaufgesunder Mann; Gewicht 54 kg (V. 25); P_s systolischer Blutdruck, Pm Mitteldruck, P_d diastolischer Blutdruck (s. Text).

Blutdrucksteigerung durch Steigerung des Minutenvolumens und Absinken des peripheren Strömungswiderstandes und *intramuskulär* dagegen eine noch länger anhaltende Blutdrucksteigerung durch Zunahme des peripheren Widerstandes bei nur wenig verändertem Minutenvolumen und Zunahme des elastischen Widerstandes hervorgerufen.

Ein weiteres eindrucksvolles Beispiel der Kreislaufwirkung des *Peripherins* nach *intramuskulärer* Injektion bringen wir in den Kurven der Abb. 6, die bei einem kreislaufgesunden, 38jährigen Ulcuskranken erhoben wurden.

Wir verzichten hier auf die Wiedergabe der Kurven der intravenösen Injektion bei derselben Versuchsperson (vgl. Tabelle 1, V. 25); sie ver-

laufen grundsätzlich ähnlich den oben beschriebenen Kreislaufreaktionen nach i.v. Injektionen. Hierbei war eine Wirkungsdauer von etwa 3 Stunden zu beobachten. Wie aus der Abb. 6 ersichtlich, ist die Dauer der Wirkung nach i.m. Injektion auch hier nach 3 Stunden keineswegs beendet. Das Maximum der Wirkung tritt nach 80 Min. auf, während es nach i.v. Injektion nach wenigen Minuten zu verzeichnen war. Wie in dem Beispiel der Abb. 3 nimmt auch hier nach i.m. Injektion der diastolische Druck zu, die Druckamplitude jedoch aber verhältnismäßig viel stärker. Die Zunahme der Druckamplitude beruht hier nicht wie bei intravenösen Injektionen auf einer Zunahme des Schlagvolumens, sondern ist ausschließlich durch das Ansteigen des elastischen Widerstandes verursacht. Die Kurven des Schlag- und Minutenvolumens zeigen in den ersten 40 Min. nach der Injektion eine geringe initiale Senkung, im weiteren Verlauf wird jedoch annähernd wieder der Ausgangswert erreicht. Die wesentlichste Reaktion ist auch in diesem Versuch in einem Ansteigen des peripheren Strömungswiderstandes zu sehen.

Besprechung der Ergebnisse.

Von verschiedener Seite wurde der Versuch unternommen, durch Kombination des Ephedrins mit anderen herz- und gefäßwirksamen Stoffen die Wirkung auf den Kreislauf im günstigen Sinne zu beeinflussen und insbesondere bei Kollapszuständen eine intensivere Wirkung zu erzielen. So wurde im *Ephedralin* Ephedrin mit Adrenalin kombiniert, nachdem Schaumann[12] gezeigt hatte, daß die blutdrucksteigernde Wirkung des Adrenalins durch eine vorherige Ephedrininjektion bedeutend gesteigert werden konnte. Ferner wiesen Gros und Hofmann[13] nach, daß bei veronalvergifteten Ratten die Darreichung der Kombination *Cardiazol-Ephedrin* die tödliche Wirkung auch überletaler Veronalgaben aufzuheben vermag, während Ephedrin allein die Mortalität der Veronalvergiftung nicht beeinflußt. In dem Präparat *Ephetonnum liquidum compositum* findet sich außer dem razemischen Ephedrin die Verbindung Pyrazincarbonsäure-isopropylidenhydrazid, welche eine ausgesprochene Herzwirkung besitzen soll (E. Müller[14]). Nach den Versuchen von Wezler und Thauer[6] läßt sich mit dieser Kombination als Dauerwirkung eine erhebliche Steigerung von Schlag- und Minutenvolumen erzielen; allerdings kommt im Beginn der Kreislaufreaktion eine vorübergehende Senkung des Minutenvolumens zum Durchbruch. Schließlich gelang es Wezler und Thauer[6], in dem Präparat *Peripherin* durch Kombination des Ephedrins mit Theophyllin die Kreislaufwirkung des Ephedrins abzuändern.

Wie wir in unseren Versuchen bestätigen konnten, muß der wesentliche Vorteil der Kombination des Ephedrins mit Theophyllin darin gesehen werden, daß es gelingt, durch den Theophyllinzusatz die Wir-

kung auf die peripheren Widerstände auszuschalten und eine Steigerung des Minutenvolumens von recht bemerkenswertem Ausmaß zu erzielen. Besonders günstig erscheint, daß die Zunahme des Minutenvolumens im wesentlichen durch ein Ansteigen des Schlagvolumens erfolgt; die Pulsfrequenz wird durch Peripherin kaum beeinflußt. Hervorzuheben ist schließlich die außerordentlich lang anhaltende Wirkung, die sich bei normalen Kreislaufverhältnissen über viele Stunden erstrecken kann.

Für die praktische Anwendung des Peripherins insbesondere bei akuten Kollapszuständen, erscheint von Bedeutung, daß bei intravenöser und intramuskulärer Gabe des Präparats eine grundsätzlich verschiedene Kreislaufwirkung beobachtet wird. Die geschilderte *Zunahme des Schlag- und Minutenvolumens* läßt sich *nur bei intravenöser Injektion* feststellen. Nach *intramuskulärer* Injektion besteht die typische Kreislaufwirkung des Peripherins in einem *Ansteigen der peripheren Widerstände*, ähnlich wie bei Injektion von Ephedrin allein. Diese verschiedene Wirkung des Peripherins auf die einzelnen Kreislaufgrößen bei intravenöser und intramuskulärer Injektion beruht möglicherweise auf veränderten Resorptionsverhältnissen. Bei intravenöser Injektion kommen die einzelnen Komponenten des Peripherins gleichzeitig zur Wirkung, während bei intramuskulärer Injektion offenbar die Resorption des Ephedrins der des Theophyllins zeitlich vorausgeht. Dafür spricht die initiale Senkung des Minutenvolumens bei intramuskulärer Injektion. Bemerkenswert ist jedoch auch bei intramuskulärer Injektion die lang anhaltende Dauer der Kreislaufwirkung.

Zusammenfassung.

Die Kreislaufwirkung des *Peripherins* besteht bei kreislaufgesunden Menschen in einer außerordentlich lang anhaltenden Blutdrucksteigerung, die bei *intravenöser* Injektion im wesentlichen durch Ansteigen des Schlag- und Minutenvolumens und nach *intramuskulärer* Gabe vor allem durch Zunahme des peripheren Strömungswiderstandes verursacht wird; eine nennenswerte Beeinflussung der Pulsfrequenz findet hierbei nicht statt.

Literatur.

[1] Chen and Schmidt: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **21**, 351; **24**, 339. — [2] Rühl, A.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **157**, 129 (1930); **164**, 8 (1932). — [3] Kiese, M., R. Garan u. A. Krautwald: Klin. Wschr. **1938 I**, 967. — [4] Halsey, J. T.: J. Pharmacol. (Am.) **32**, 89. — [5] Trendelenburg, P.: Med. Klin. **41**, 1505 (1929). — [6] Wezler, K. u. R. Thauer: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **201**, 105, (1943). — [7] Böger, A., B. Deppe u. K. Wezler: Naunyn- Schmiedebergs Arch. **189**, 480 (1938). — [8] Euler, U. S. u. G. Liljestrand: Skand. Arch. Physiol. (D.) **55**, 1 (1929). — [9] Nogarede, F.: Bull. Soc. belg. cardiol. **6**, 316 (1939). — [10] Rudolf, R. D. and J. D. Graham: Amer. J. med. Sci. **173**, 399 (1927). — [11] Wezler, K. u. A. Böger: Erg. Physiol. **41**, 292 (1939). — [12] Schaumann, O.: Naunyn- Schmiedebergs Arch. **138**, 208 (1928). — [13] Gros, O. u. H. Hofmann: Klin. Wschr. **1938 I**, 967. — [14] Müller, E.: Dtsch. med. Wschr. **1938 I**, 339.

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Greifswald
(Direktor: Prof. Dr. F. A. Hoppe-Seyler †).

Untersuchungen über Cholinesterase im Blut nach experimentellen Schädigungen.

IV. Mitteilung.

Das Verhalten der Cholinesterase im Blutserum nach örtlicher Verbrennung.

Von

Norbert Schümmelfeder.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 13. März 1947.)

In der vorigen Mitteilung[1] wurde über das Verhalten der Cholinesterase im Vollblut und Serum von Hunden während experimenteller lokaler Verbrennungen berichtet. Die Verbrennung wurde damals bis zum Tod der narkotisierten Versuchstiere fortgesetzt. In allen Fällen kam es zu erheblicher Hyperthermie, zum Abfall des Blutdrucks im tödlichen Schock, zu nicht regelmäßigen Änderungen der Cholinesteraseaktivität (EA) im hämolysierten Vollblut (auf die hier störend wirkenden verschiedenen Faktoren wurde besonders hingewiesen) und zu regelmäßig auftretenden Steigerungen der EA im Serum (bis 29%).

Wie diese Steigerungen im Serum zu deuten seien, blieb unsicher. Es wurde vor allem daran gedacht, daß es sich um Ausschwemmung von Gewebsesterase oder auch von Aktivatoren der Serumesterase aus den geschädigten Organen handle (vgl. die Vorstellungen Pfeiffers[2] u. a.[3] über Ausschwemmung proteolytischer Fermente aus geschädigten Geweben nach Verbrennungen). Andererseits sprach viel dafür, daß es sich um Schwankungen der EA handeln könne, die als Zeichen blutdruckregulatorischer Funktionen des Ferments nach Art der Vorstellungen von Zinnitz[4], allerdings im Sinne von Pirolli[5] als Gegenregulation gegen depressorische Faktoren aufgefaßt werden könnten. In Weiterführung derartiger Überlegungen war auch eine erhöhte Bildung und verstärkte Abgabe der Cholinesterase aus besonderen

[1] Schümmelfeder, N.: Arch. exper. Path. (D.) (III. Mitt.) **204**, 567 (1947). — [2] Pfeiffer, H.: Krhk.forsch. **1**, 407 (1925). — [3] Zink, K. H.: Pathologische Anatomie der Verbrennung. Jena: Gustav Fischer 1940. — [4] Zinnitz, F.: Arch. exper. Path. (D.) **194**, 316 (1940). — Zinnitz, F. u. E. Rentz: Arch. exper. Path. (D.) **195**, 329 (1940). — [5] Pirolli, M.: Cuore **25**, 414 (1941).

Bildungsorten (Leber, Pankreas ?[6] in Betracht zu ziehen, welche, vielleicht durch nervöse Reize ausgelöst, von Bedeutung für die Kreislaufregulation sein könnte. Es erschien möglich, daß Versuche mit kürzer dauernder Verbrennung zur Klärung dieser Fragen beitragen, daneben auch zeigen könnten, ob Esterase- und Temperaturanstieg parallel laufen, die Esteraseveränderungen also vielleicht zentral bedingte Folgeerscheinungen der Hyperthermie darstellen.

Versuche. An 6 Hunden wurden daher Verbrennungen von 25—60 Min. Dauer ausgeführt. Die Versuchsanordnung war im übrigen in allen Einzelheiten die gleiche wie in den Versuchen zur vorhergehenden Mitteilung[1]. Bei der Verbrennung von kürzerer Dauer kam es nicht sofort zum Tod der Versuchstiere, sondern dieser trat je nach Schwere der Verbrennung frühestens $1^1/_2$, spätestens 4 Stunden nach Beginn und frühestens 29 Min., spätestens 192 Min. nach Absetzen der Verbrennung ein. Ein Hund (Nr. 56) wurde vorzeitig, $2^1/_2$ Stunden nach Absetzen der Verbrennung getötet, nachdem der Blutdruck von 180 auf 80 mm Hg gesunken war. Bei allen anderen Versuchshunden fiel der Blutdruck unmittelbar vor dem Tod im Schock bis auf 20 bis 40 mm Hg ab. Die Rektaltemperaturen stiegen in allen Fällen auch nach Beendigung der Verbrennung weiter an (Abb. 1). Der Blutdruck sank bei den meisten Tieren schon während der Verbrennung erheblich ab. Nach Beendigung der Hitzeeinwirkung wurden die Tiere zunehmend empfindlicher gegen Blutentnahmen; schon einmalige Entnahme von 80 ccm Blut bei einem 21 kg schweren Hund (Nr. 54) führte z. B. zu einer Blutdrucksenkung von etwa 45 mm Hg. Bei den leichteren Hunden kam es auch nach geringeren Entnahmen zu ähnlich starken Senkungen, die dann häufig den tödlich endenden Blutdruckabfall einleiteten. Als Beispiel sei die Blutdruckkurve des Hundes 54 (Abb. 2) wiedergegeben.

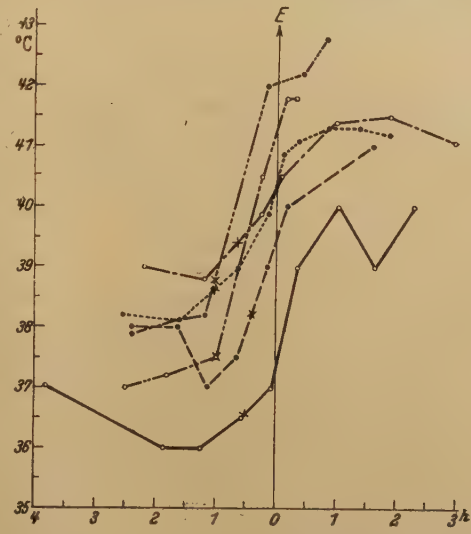


Abb. 1. ——— Hund 54; — — — Hund 56; ———· Hund 58; ····· Hund 59; ·–·–· Hund 64; ––––– Hund 66; —x— Beginn der Verbrennung; *E* Ende der Verbrennung.

[6] Faber, M.: Studier over Serumcholinesterasens Variationer. Diss. Kopenhagen 1941. — Boyet, D. et D. Santenoise: C. r. Soc. Biol. **135**, 844 (1941).

Auswertungen der Cholinesterase wurden nur im Serum ausgeführt, die Ergebnisse sind in Abb. 3 zusammengestellt.

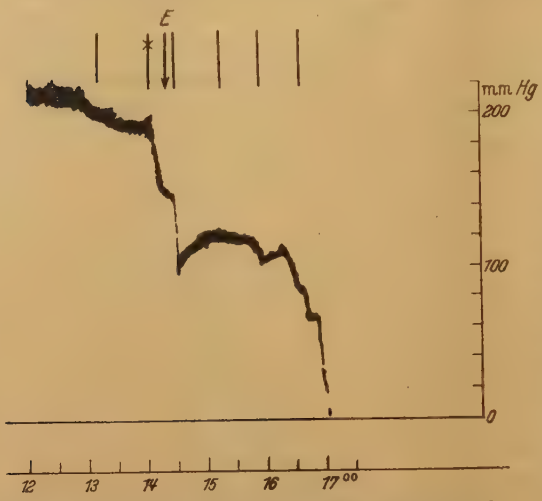


Abb. 2. * Beginn der Verbrennung; *E* Ende der Verbrennung. Die übrigen Marken geben den jeweiligen Zeitpunkt der einzelnen Blutentnahmen zur Auswertung der Cholinesterase im Serum an.

Besprechung der Ergebnisse. Bei Beurteilung der Ergebnisse muß berücksichtigt werden, daß die Intensität der Verbrennung in allen Versuchen annähernd die gleiche war; die an Gewicht leichteren Hunde wurden also verhältnismäßig stärker geschädigt als die schwereren. Bei ersteren war außerdem die Verbrennungsdauer um durchschnittlich 30 Min. länger als bei der letzten Tiergruppe. Betrachtet man die Kurven der Abb. 3 unter diesem Gesichtspunkt, so zeigt sich, daß es bei den beiden Versuchshunden mit geringstem Körpergewicht (Nr. 64, 66) und stärkstem Verbrennungsschaden (60 Min.) während der Verbrennung zum stärkeren Anstieg der EA (um etwa 20%) kam, während nach Absetzen der Verbrennung und kurz vor dem Tod die Werte der Cholinesterase rasch wieder bis zum Ausgangspunkt oder etwas tiefer absanken. Bei 3 Hunden von mittlerem Gewicht (Nr. 56, 58, 59; Dauer der Verbrennung: 25, 40, 60 Min.) kam es zu Anstiegen der EA auch noch nach Beendigung der Verbrennung, bei dem leichtesten Tier aus dieser Gruppe (Nr. 56) trotz der hier kurzen Verbrennungsdauer zum Abfall unmittelbar vor Abbruch des Versuches, bei den beiden anderen Tieren dagegen zum Weiteranstieg und in einem Fall zu den überhaupt höchsten Ester-

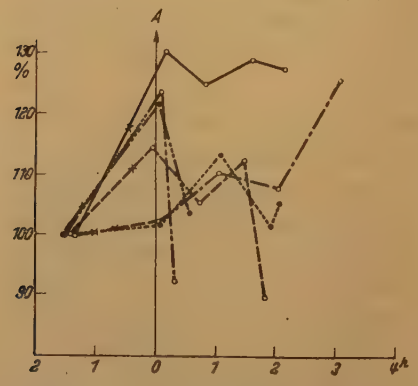


Abb. 3. —— Hund 54, 21,0 kg; ——— Hund 56, 15,7 kg; —·—· Hund 58, 17,5 kg; ····· Hund 59, 17,5 kg; —·· Hund 64, 13,5 kg; ——·—· Hund 66, 12,0 kg; —x— Beginn der Verbrennung; *A* Absetzen der Verbrennung.

asewerten dieser Versuchsgruppe. Bei dem Versuchstier (Nr. 54) mit dem höchsten Körpergewicht (Verbrennungsdauer: 30 Min.) hielt sich die EA nach erheblichem Anstieg während der Verbrennung (etwa 30%) mit leichten Schwankungen bis zum Tod auf dieser Höhe.

Hiernach liegt die Vorstellung nahe, daß der Anstieg der EA im Serum etwas wie eine Gegenregulation gegen depressorische Reize, d. h. gegen Vagusreize bzw. gegen eine vermehrte Abgabe von Azetylcholin an das Blut darstellt; eine Gegenregulation, die allerdings auch bei den kräftigsten und relativ am wenigsten geschädigten Tieren nicht ausreichte, um den Abfall des Blutdrucks im Kollaps zu verhindern, welche andererseits bei den schwächsten und verhältnismäßig stark geschädigten Tieren frühzeitig unterdrückt wurde. Falls der Anstieg der EA im Serum auf Ausschwemmung von Gewebsesterase zurückzuführen wäre, müßte erwartet werden, daß gerade bei den am stärksten geschädigten und daher rasch zugrunde gehenden Tieren die Esterasezunahme im Serum besonders deutlich und anhaltend sein müßte.

Es darf nicht übersehen werden, daß der Tod der Versuchstiere, wie bereits oben erwähnt, nicht allein durch den Verbrennungsschaden bewirkt wurde; mit ausgelöst wurde er vielmehr auch durch die Blutentnahmen, welche häufig die terminale Blutdrucksenkung einleiteten. Hierzu muß betont werden, daß Blutentnahmen gleichen Ausmaßes allein an narkotisierten, sonst nicht geschädigten Hunden nicht zum Tod und im allgemeinen auch nicht zu nennenswerten Blutdrucksenkungen führten[7]. Ebensowenig kam es bei derartigen Versuchen zu erheblichen Änderungen der EA, während gerade erschöpfende Blutentnahmen mit begleitenden Blutdrucksenkungen zu Steigerungen der EA im Serum führten. Auf der anderen Seite zeigte sich bei Verbrennungsversuchen, daß auch trotz Vermeidung von Blutentnahmen während und nach der Schädigung der tödliche Schock etwa nach 2—3 Stunden eintrat[8].

Nach allem dürfte die beobachtete Änderung der EA im Serum als Zeichen derjenigen Regulationsstörung anzusehen sein, welche durch die Verbrennung selbst ausgelöst wurde. Die erwähnte Empfindlichkeit schon gegen kleinere Blutverluste zeigt deutlich den bis an die Grenze des Möglichen belasteten Kreislaufzustand.

Die steigende Körpertemperatur unserer Tiere während der Versuche war offenbar ohne besonderen Einfluß auf die Änderungen der EA, die Steigerungen traten auf und gingen zurück, unabhängig von Höhe und Verlauf der Temperaturkurve. Hierauf wird besonders hingewiesen, da Villasante[9] an Kaninchen eine Abhängigkeit zwischen EA und Körpertemperatur fand; nach seinen Beobachtungen war die Aktivität der Cholinesterase am höchsten zwischen 37,5 und 38,5° C, bei höherer und niederer Temperatur war die esteratische Wirkung im Plasma, Vollblut und in den Erythrozyten geringer.

Die beobachteten Schwankungen der EA lassen sich demnach am ehesten unter der Vorstellung einer Vermehrung oder Aktivierung der

[7] Schümmelfeder, N.: Arch. exper. Path. (D.) (I. Mitt.) **204**, 464 (1947). — [8] Unveröffentlichte Versuche. — [9] Villasante, J. G.: Rev. Clin. espan. **3**, 526 (1941).

Cholinesterase im Serum als Ausdruck einer Gegenregulation bei Störungen der vegetativ-nervösen Kreislaufsteuerung verstehen. Ein Zusammenbruch der Kreislaufregulation überhaupt würde gleichzeitiges Absinken der EA bewirken. Damit sind wir der Ansicht, daß die Änderungen der Aktivität der Cholinesterase hier sekundärer Natur sind, für die *Auslösung* des Schocks können sie kaum verantwortlich gemacht werden; sie sind Teilerscheinung der im Verbrennungsschock auftretenden Regulationsänderungen des Kreislaufs.

Zusammenfassung.

Während und nach schweren örtlichen Verbrennungen wurden an narkotisierten Hunden die Änderungen der Aktivität der Cholinesterase im Serum verfolgt.

Nach der angewandten Schädigung trat bei den Versuchstieren der Tod unter allen Erscheinungen des Schocks (primärer oder Frühschock) mit charakteristischem Blutdruckabfall ein. In allen Versuchen kam es zum Anstieg der EA während der Verbrennung. Bei den relativ am geringsten geschädigten Tieren stieg die EA nach Absetzen der Verbrennung weiter an oder hielt sich auf erhöhten Werten, während stärker geschädigte Versuchshunde ein Absinken der EA-Werte vor dem Tod zeigten. Diese Änderungen der Aktivität der Cholinesterase werden aufgefaßt als Ausdruck kreislaufregulatorischer Funktionen der Cholinesterase.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn.

Über den Einfluß der Kohlensäure auf das Wachstum von Bact. coli unter verschiedenen Vegetationsbedingungen.

Von

Hans Friedrich Zipf.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 21. März 1947.)

Bei der Anwendung der manometrischen Mikromethode nach Barcroft-Warburg zur Untersuchung des bakteriellen Stoffwechsels strebte man in früheren Jahren danach, die Keimvermehrung auszuschalten, d. h. die gleiche Voraussetzung zu schaffen wie bei Atmungsversuchen an Gewebsschnitten. Denn man bezog ja die gewonnenen Versuchsergebnisse auf eine konstante Menge der lebenden Substanz, also entweder auf die Zellzahl oder wenigstens auf das Trockengewicht. Solche „ruhenden" Bakterien müssen sich in stickstofffreier Nährlösung befinden, die lediglich ein Kohlehydrat als Energiequelle für den Betriebs-, Energiestoffwechsel enthält.

Suspendiert man Bakterien im Warburg-Gefäß dagegen in stickstoffhaltigen Lösungen, dann kommt es zu einem Wachstum und somit zu Steigerungen im O_2-Verbrauch, die nicht durch eine direkte Oxydationsbeeinflussung, sondern durch Vermehrung der Bakterienzahl in der Raumeinheit zu erklären sind (Warburg und Wiesel, 1912). Im Jahre 1936 hat J. Hirsch die Beziehungen zwischen bakterieller Vermehrung und Zunahme des O_2-Verbrauchs untersucht. In der Hauptphase der Vermehrungsgeschwindigkeit (Buchanans „logarithmic growth phase") ergab sich für die Atmungsgröße wie für die Keimzahl eine etwa gleiche Steigerung, so daß in einer halblogarithmischen Darstellung die Kurven der Keimzahl und Atmungsgröße als parallele Linien erscheinen (lineare Phase). Somit ist es möglich, die bisherigen Keimzahlbestimmungen zwar nicht zu ersetzen, doch auf eine zusätzliche Weise jede Änderung in der Vermehrungsgeschwindigkeit aerober Bakterien genau an der O_2-Verbrauchskurve zu verfolgen. Die Barcroft-Warburg-Methode eignet sich damit zur Klärung vieler theoretischer und praktischer Fragen, die Energie-, Bau-, Wuchsstoffe sowie chemotherapeutisch wirksame Substanzen betreffen.

Mit dieser neuen Methode hat Hirsch 1941/42 ausführliche Untersuchungen über die Beeinflussung der O_2-Verbrauchskurven verschie-

dener Erreger (Bact. coli, Bact. typhi, Staphyl. aureus, Proteus vulgaris) vorgenommen, und zwar mit Sulfonamiden, „Inhibitoren", „Akzeleratoren" usw. Dabei kamen Nährmedien bekannter und nicht definierter Zusammensetzung zur Verwendung. SOEHRING (1942) berichtet über die atmungssenkende Wirkung verschiedener Sulfonamidpräparate bei Kolibakterien, die in synthetischer Nährlösung wuchsen. Auffällig ist die Mitteilung, die HIRSCH 1941 veröffentlichte: Bei der Züchtung von 7 Stämmen hämolytischer Streptokokken bzw. Scharlachstreptokokken auf Blutbouillon in der BARCROFT-WARBURG-Apparatur fehlte bei 2 Stämmen die Vermehrung völlig. Diese Hemmung ließ sich verhüten entweder durch Weglassen der KOH als Absorptionsmittel für CO_2 oder wenigstens durch Unterlassung der Schüttelbewegung, die die CO_2-Abgasung ja unterstützt, weiterhin aber auch durch Hinzufügung von $NaHCO_3$ zu der Versuchskultur. Mit dieser Beobachtung war ein ganz wesentliches Gebiet gestreift worden, nämlich der Einfluß der Kohlensäure auf das Bakterienwachstum. Auffallend ist, wie wenig Bezug darauf in unserer inländischen Literatur genommen wird.

Wir haben selbst in einer größeren Reihe von Versuchen mit Kolibakterien Atmungsversuche in der BARCROFT-WARBURG-Apparatur durchgeführt und uns auch methodischer Angaben bisheriger Untersucher hinsichtlich der Zubereitung unserer Kulturen bzw. der Einsaaten bedient. Unabhängig von der HIRSCHschen Beobachtung von 1941 haben wir bei dieser manometrischen Messung des O_2-Verbrauchs eine Reihe von interessanten Beobachtungen bezüglich der Wichtigkeit der CO_2 für das Bakterienwachstum in definierten Medien machen können. In der weitaus überwiegenden Zahl unserer Versuche kam es während der üblichen Versuchszeit bei CO_2-Entfernung durch KOH und gleichzeitiger Schüttelbewegung zu Wachstumshemmungen und -verzögerungen. Dies ist um so bemerkenswerter, da solche CO_2-Mangelerscheinungen bisher nur unter anderen Versuchsbedingungen beschrieben wurden, nicht aber mittels einer Methodik, die nach HIRSCH gerade zu Wachstumsversuchen geeignet erscheint. Unabhängig auch von den unten angeführten Beobachtungen der ausländischen Literatur konnten wir dabei Bedingungen herausfinden, die solche Wachstumshemmungen verhüten helfen. Diese eigenen Befunde sind gewiß von Bedeutung für die weitere methodische und theoretische Behandlung von Stoffwechseluntersuchungen mit der BARCROFT-WARBURG-Methode und wollen eine Anregung geben zur genaueren Beachtung anscheinend „nicht gelungener" Versuche bzw. „nicht angegangener" Kulturen.

Eine kurze Darstellung der Rolle, die die Kohlensäure in den bisherigen, besonders von ausländischen Untersuchern durchgeführten bakteriellen Wachstumsversuchen spielte, erscheint uns dabei zum Verständnis wesentlich.

Literaturübersicht.

Im Jahre 1908 glaubte Nowak eine wachstumsfördernde Einwirkung für B. abortus annehmen zu müssen, wenn die O_2-Konzentration in der umgebenden Luft verringert wurde. Deshalb ließ er gleichzeitig in derselben Atmosphäre eine Aerobierkultur von B. subtilis wachsen. Ähnliches behaupteten Wherry und Oliver (1916), Ruediger (1919) und Swartz und Davis (1920) für den Gonokokkus, weiterhin Cohen und Markle (1916) sowie Cohen (1918) für den Meningokokkus. Nicht lange danach entdeckte man, daß der Gonokokkus (Chapin, 1918), der Meningokokkus (Cohen und Fleming, 1918; Kohman, 1919) und B. abortus gleich gutes Wachstum zeigten, wenn die Begleitkultur von B. subtilis durch 10% CO_2 enthaltende Luft ersetzt wurde. So waren also die Ergebnisse Nowaks zu erklären aus der CO_2-Produktion seiner Begleitkulturen.

Wherry und Ervin (1918) beobachteten völligen Wachstumsmangel an Tuberkelbazillen bei Absorption der CO_2 über dem Medium durch NaOH, auch bei Verwendung fester Nährböden. Dieses Fehlen des Wachstums bei CO_2-Mangel wurde in der Folgezeit bestätigt (Rockwell 1921, 1923, 1924; Rockwell und Highberger 1926, 1927; Rockwell und McKhann 1931) und auf das Wachstum vieler Laboratoriumsstämme ausgedehnt, unter anderem von Valley und Rettger (1927) auf über 100 geprüfte Mikroorganismen. Valley gab 1928 einen zusammenfassenden Überblick über die gesamte frühere Literatur.

Waren die bisherigen Versuche an festen Pepton-Agarmedien durchgeführt worden, so gelang es Walker (1932) an einem flüssigen Medium bekannter Zusammensetzung (Laktose, Ammoniumtartrat und Ammoniumphosphat) zu zeigen, daß Kolibakterien innerhalb 24 Stunden nicht wuchsen, wenn bei der Bebrütung eine Durchlüftung mit einem CO_2-freien Luftstrom erfolgte. Nach Aufhören der Durchlüftung trat ein Wachstum innerhalb weniger Stunden ein. Winslow, Walker und Sutermeister (1932) konnten diesen völligen Wachstumsmangel innerhalb CO_2-freier Luft in (laktosehaltigen) Pepton- und Bouillonlösungen nicht beobachten. Immerhin kam es noch zu einer gewissen Wachstumsverzögerung. Mit derselben Technik wie Walker untersuchten G. P. Gladstone, P. Fildes und G. M. Richardson (1935) mehrere Bakterienarten (Bact. typhosum, Bact. coli, Ps. pyocyanea, Staphylococcus, aureus, B. subtilis, B. anthracis, C. diphtheriae, Cl. sporogenes und Cl. Welchii) in einfachen Nährlösungen bekannter Zusammensetzung auf ihre Wachstumsfähigkeit, wobei es sich erwies, daß die Anwesenheit von CO_2 Voraussetzung ist für ein Angehen der Kulturen. Der Grenzwert lag unter dem der atmosphärischen Luft (0,03%). Der Wachstumsmangel durch CO_2-Entziehung bestand nicht bei Gegenwart von Pepton oder Bouillon. Gehemmte Kulturen waren nie tot. Fehlte manchmal ein völliger Wachstumsmangel, so trat immerhin noch eine Verzögerung auf. Zur Beantwortung der Frage, ob die CO_2-Entgasung der Nährlösungen eine p_H-Änderung bedingte, und somit eine Erklärung lieferte für die Wachstumsverhinderung, ließen diese Untersucher einen Bakterienstamm (Bact. typhosum) bei verschiedenem p_H (5,8—8,0) wachsen und fanden nach aufgetretener Wachstumsverhinderung, daß der p_H-Gehalt unverändert geblieben war. Somit konnte der CO_2-Effekt nicht auf p_H-Änderungen zurückgeführt werden. Auch wiesen sie nach, daß Zusatz von Mol/800 bis Mol/100 $NaHCO_3$ zur Nährlösung den Wachstumsmangel bei Durchlüftung mit CO_2-freier Luft nicht verhüten konnte. Dabei ist zu beachten, daß in einem natriumbikarbonathaltigen Medium ein Gleichgewicht zwischen CO_2, H_2CO_3, HCO_3'-, CO_3''-, Na^+- und OH'-Ionen besteht, das abhängig ist vom Partialdruck der über der Lösung stehenden CO_2. Durch Absorption oder Auslüftung der letzteren muß sich also der p_H allmählich nach der alkalischen Seite hin verändern, da die NaOH, Na^+-, und OH-Ionen zurück-

bleiben. Durch Wahl eines Bakterienstammes (Bact. typhosum), der innerhalb solcher p_H-Änderungen (bis zu p_H-9,0) noch wuchs, konnten die obigen Untersucher im bikarbonathaltigen Milieu den gleichen Mangeleffekt einstellen. Damit dürfte die *Frage der p_H-Änderung* genügend ausgeschlossen sein. Auch durch eine Aufschwemmung von $MgCO_3$, weiterhin durch Einführung schwacher Säuren, z. B. in Form von essigsaurem, kapronsaurem Salz und Tiglinsäure in die Nährlösung, war keine Wirkung zu erhalten, so daß CO_2 durch diese Stoffe nicht ersetzt werden kann. Nach den Untersuchungen derselben Forscher spielte in einfachen Medien das Alter des Inoculums (2stündig, 24 Stunden, 2—7 Tage) keine Rolle, immer bestand bei Durchlüftung mit CO_2-freier Luft der Wachstumsmangel. Wenn allerdings ein Hefezusatz zum synthetischen Medium erfolgte, war das Alter der Einsaat wichtig, in dem nämlich ein junges Inoculum meistens wuchs, ein älteres gewöhnlich aber nicht. Die *Einsatzgröße* wurde zwar nicht genau bestimmt, doch bei über etwa $2000 \cdot 10^6$ Organismen (bei einer jungen Kultur von Bact. typhosum) fand trotz schneller Durchlüftung mit CO_2-freier Luft ein Wachstum statt. Eine schon im Wachstum befindliche Kultur — während der logarithmischen Phase — konnte gleicherweise nicht an der weiteren Vermehrung gehindert werden, sondern wuchs zum Optimum aus. Damit bestätigten sie eine ähnliche Beobachtung von WINSLOW, WALKER und SUTERMEISTER (1932). Nach S. DAGLEY und C. M. HINSHELWOOD (1938) wächst Bact. lactis aerogenes in einem synthetischen Medium nicht bei vollkommener Abwesenheit von CO_2.

Im Jahre 1939 berichteten nun FULLER, COLEBROOK und MAXTED, daß für das Schicksal hämolytischer Streptokokken in normalem (defibriniertem) menschlichem Blut neben destruktiv wirksamen Komponenten, wie Leukozyten, opsonische und protryptische Fähigkeiten des Serums, sowie neben den ursprünglich vorhandenen Ernährungsbedingungen im Blut der rasche CO_2-Verlust eine besondere Rolle spielt, der dann eintritt, wenn Blut in offenen Röhrchen bei 37° C bewegt wird. Verschließt man die Röhrchen und achtet auf einen kleinen Luftraum über der Kultur, dann ist der CO_2-Verlust nicht groß genug, um das Überleben und die Vermehrung der Streptokokken zu unterbinden. Menschliches und tierisches Serum wird rasch alkalisch ($p_H = 9—10$), wenn offene Röhrchen bei 37° C bewegt werden. Hämolytische Streptokokken können in einem solchen Serum nicht überleben. Wenn diese Verschiebung nach der alkalischen Seite hin dadurch gehemmt wurde, daß man die Streptokokken in geschlossenen Röhrchen mit kleinem Luftraum wachsen ließ, wurde der CO_2-Verlust geringer, und es kam zu einer starken Vermehrung. Ein Zusatz von 0,1% folgender Fettsäuren zu Menschenblut: Önanthsäure $CH_3(CH_2)_5COOH$, Undecylsäure $CH_3(CH_2)_9 \cdot COOH$ und Stearinsäure $CH_3 \cdot (CH_2)_{16} \cdot COOH$ ermöglichten ebenfalls kein Wachstum. Dagegen fand ein solches statt mit Adipinsäure ($C_4 8_8$: $(COOH)_2$ und Sebacinsäure (C_8H_{16}: $(COOH)_2$, jedoch nicht mehr, wenn diese auf $p_H = 7,4$ neutralisiert wurden.

Endlich sei auf die eingangs erwähnten Befunde von HIRSCH (1941) hingewiesen.

Versuchsbedingungen.

A. Synthetische Nährmedien.

1. *Mol/10 Asparaginsäure — 1% Glukose — Mol/15 Phosphatpuffer*; $p_H = 7,2$.
2. *Mol/10 Asparagin — 1% Glukose — Mol/15 Phosphatpuffer*; $p_H = 7,2$.

Das Wachstum der Kolibakterien ist nach BRAUN und CAHN-BRONNER (1922), weiterhin nach BRAUN und GOLDSCHMIDT (1928) möglich auf einem Nährmedium, das als einzige N-Quelle Asparaginsäure enthält. Doch bleibt die Vermehrungsintensität erheblich zurück hinter derjenigen in peptonhaltigen Lösungen oder einem solchen optimalen Medium, wie es das „KNIGHT-Medium" darstellt.

3. „KNIGHT-*Medium*."

Diese synthetische Nährlösung wurde von FILDES und RICHARDSON (1937) für Staphylococcus aureus aus der halbsynthetischen Gelatine-Nährlösung KNIGHTS (1935) entwickelt und enthält die von KNIGHT (1937) für Staphylococcus aureus als notwendig erkannten Wuchsstoffe Thiamin und Nikotinsäureamid. Im einzelnen wurde dieses „KNIGHT-Medium" folgendermaßen zubereitet:

Zunächst wurde ein sog. *„Aminosäurengemisch"*:

KH_2PO_4	4,5 g	l-Oxyprolin	0,08 g
Aqua dest.	550 ccm	d,l-Asparaginsäure	0,18 g
n-NaOH	26 ccm	d-Glutaminsäure	0,09 g
d,l-Alanin	0,12 g	d,l-β-Phenyl-β-Alanin	0,08 g
d,l-Leucin	0,17 g	l-Tyrosin	0,05 g
d,l-Valin	0,15 g	d-Arginin	0,05 g
Glycin	0,05 g	l-Histidin-HCl	0,05 g
d,l-Prolin	0,07 g	d-Lysin	0,09 g

hergestellt, auf $p_H = 7{,}4$ mittels NaOH eingestellt, auf 600 ccm aufgefüllt und sterilisiert. Zu je 24 ccm des Aminosäurengemisches wurden nun folgende einzeln sterilisierten Substanzen zugesetzt:

Aqua dest.	9,2 ccm
Ferro-Ammonsulfat, Mol/500 in Mol/50 HCl	1,0 ccm
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ Mol/60	0,4 ccm
$NaNO_3$ Mol/5	0,4 ccm
Thiamin (= Vit. B_1) Mol/2000 in Mol/1000 HCl	0,8 ccm
Nikotinsäureamid Mol/2000	0,8 ccm
d,l-Methionin Mol/100	0,8 ccm
Tryptophan Mol/1000	0,4 ccm
Cystin Mol/100 in Mol/10 HCl	0,8 ccm
NaOH Mol/5	0,4 ccm
Glukose Mol/2	1,0 ccm
	16,0 ccm

B. Bakterienmaterial und Einsaat.

Es kamen verschiedene pathogene Stämme von *Kolibakterien* zur Verwendung, die uns vom Hygienischen Institut der Universität Bonn (Prof. Dr. SELTER) freundlichst zur Verfügung gestellt wurden. Teils von Nähragarschrägröhrchen, teils von Endoagarplatten stammend, wurde in allen Fällen, wo eine Übernahme von Pepton oder Bouillon oder sonstigen „Akzeleratoren" in die Versuchskultur vermieden werden sollte, entweder mindestens eine Passage der Ausgangskultur im neuen synthetischen Nährmedium, oder, falls die Passage auf Nähragarschrägröhrchen erfolgte, eine gründliche Waschung auf der Zentrifuge mittels Mol/15 Phosphatpuffer ($p_H = 7{,}2$) durchgeführt. Die *Bestimmung der Einsaatgröße* geschah durch *Keimzählung* nach WOHLFEIL (1933) in der modifizierten BÜRKERschen Zählkammer. Es kann gleich an dieser Stelle festgestellt werden, daß nach unseren Erfahrungen auch dieser Methode Mängel anhaften, insbesondere durch die verschieden großen Keimdichten innerhalb derselben, als auch wiederholter — meist 4 — Kammerfüllungen. Die *Keimzahl je 1 ccm* ist als Vielfaches von 10^5—10^7 angegeben.

C. Manometrische BARCROFT-WARBURG-*Methode.*

Technische Angaben entnahmen wir F. DICKENS (aus den „Methoden der Fermentforschung von BAMANN-MYRBÄCK, 1941, Bd. I, S. 985). Unsere Kulturen von meist 2 ccm (in einigen Versuchen auch 3 und 1 ccm) wurden in kegelförmigen *15-ccm*-Atmungsgefäßen (mit *einem* seitlichen Ansatz) bei 37,5° C Wasserbadtemperatur mit 100 (nur bei dem Versuch 23 mit 80, bei den Versuchen 24, 25,

26, 27, 28 mit je 90 und bei Versuch 42 mit 120) Schwingungen je Minute bewegt. Die Schwingungsamplitude betrug etwa 5 cm. Die CO_2-Absorption geschah durch 0,2 ccm 33% KOH vom Innentrögchen aus (in wenigen Versuchen 0,3 ccm). Zusätze zu unseren Nährlösungen erfolgten schon beim Anrichten der Versuchskultur, also nicht erst während des Versuches. Manometerausschläge unterhalb 5 mm wurden nicht berücksichtigt, da sie innerhalb der methodischen Fehlergrenze liegen. Die Manometerablesungen erfolgten alle 30 Min. Gleichzeitig wurde durch kurzfristige Herausnahme der Schüttelrahmen eine Wachstumskontrolle der Gefäßinhalte vorgenommen. Die übliche Ablesungspause erhöhte sich daher um etwa 1 Min.

Bei der *Wachstumskontrolle* wurden folgende Trübungsgrade angenommen: (+) *eben erkennbare, schwache Trübung*; + *deutliche, gut durchsichtige Trübung*; (++) schlecht durchsichtige Trübung; ++ *undurchsichtig gewordene Trübung*; +++ milchig weiße Trübung bzw. Sedimentierung.

Diese Trübungszeichen sind den jeweiligen O_2-Verbrauchswerten in den Tabellen beigefügt.

Die Kontrollkulturen im Brutschrank, d. h. also bei 37,5° C, Ruhe und fehlender KOH, befanden sich ebenfalls in verschlossenen Atmungsgefäßen.

Versuche.

A. Der Hemmungseffekt durch CO_2-Mangel innerhalb synthetischer Nährlösungen.

1. Mol/10 Asparagin — 1% Glukose — Phosphatpuffer ($p_H = 7{,}2$).

In einigen Vorversuchen (7—13) wollten wir mit Asparagin-Glukose-Phosphatpuffer ($p_H = 7{,}2$) Kolibakterien in der BARCROFT-WARBURG-Apparatur zur Atmung bringen. Über das negative Ergebnis der Bemühungen waren wir insofern überrascht, als die Brutschrankkontrollen (ohne KOH) ein Wachstum aufwiesen und auch die Versuchskulturen selbst nach Versuchsende nachzuwachsen begannen. Es kamen nur zwei Faktoren in Frage, entweder die *Schüttelbewegung* oder die *CO_2-Absorption durch KOH*. Die darauf folgenden Versuche 15, 19, 20, 21, 22 und 24 klärten diese Frage.

Versuch 24. Kolibakterienstamm H_4. Blutagarplatte. Drei Passagen hintereinander (15, 32, 15 Stunden) durch folgende Nährlösung: Mol/10 Asparagin + 1% Glukose in Mol/15 Phosphatpuffer; $p_H = 6{,}8$. Herstellung der Gesamtversuchskultur durch Übertragung von 4 Tropfen der letzten 15 Stunden Passagenkultur auf 30 ccm Nährlösung. Keimzahl in 1 ccm $= 1260 \cdot 10^6$. Schüttelgeschwindigkeit: 90/Min. 37,5° C. Zur CO_2-Absorption: 0,2 ccm, 33% KOH. Einzelkulturmenge 2 ccm.

Dabei wurde die eine Hälfte der Versuchsgefäße in Ruhe gehalten, die andere geschüttelt, und von den Ruhe- und Bewegungsgefäßen nur je die halbe Zahl mit KOH beschickt. Deutlich ist in Tabelle 1 zu erkennen, daß die „*Bewegungskulturen*" *ohne KOH* eher eine Wachstumsbeschleunigung aufweisen gegenüber den „*Ruhekulturen* ohne *KOH*". Die Bewegung als solche kann also nicht der Grund sein, warum jegliche Atmungssteigerung bzw. jegliches Wachstum bei den „*Bewegungskulturen mit KOH*" fehlt. Die „*Ruhekulturen mit KOH*" zeigen nur

Tabelle 1. *Versuch 24. Kolibakterien in Mol/10 Asparagin — 1% Glukose — Mol/15 Phosphatpuffer, $p_H = 6{,}8$. Atmungs- und Wachstumsversuch in der* BARCROFT-WARBURG-*Apparatur.*

↓ Sämtliche Versuchskulturen bei Ruhe, offenen Manometerhähnen unter 37,5° C im Thermostaten belassen. Bei — weder O_2-Verbrauch noch Wachstum. Die Zahlen bedeuten Verbrauch von Kubikmillimeter O_2 je 1 ccm innerhalb 30 Min. Sichtbare Wachstumssteigerung durch Zeichen ? bis +++ angegeben.

Versuchskulturen von 2 ccm³			30 Min.	1 Std.	1½ Std.	2 Std.	2½ Std.	3 Std.	3½ Std.	4 Std.	4½ Std.	5 Std.	5½ Std.	6 Std.	6½ Std.	7 Std.	↓	24 Std.
mit KOH	Bewegung	1.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		+++
		2.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		+++
		3.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		+++
	Ruhe	4.	—	—	—	—	—	—	?	(+)	+	+	+	(++)	++	++		+++
		5.	—	—	—	—	—	—	?	(+)	+	+	+	(++)	++	++		+++
		6.	—	—	—	—	—	—	?	(+)	+	+	+	(++)	++	++		+++
ohne KOH	Bewegung	7.	—	—	—	—	—	?	(+)	+	+	+	++	++	++	+++		+++
		8.	—	—	—	—	?	(+)	(+)	+	+	+	++	++	++	+++		+++
		9.	—	—	—	—	?	(+)	(+)	+	+	+	++	++	++	+++		+++
	Ruhe	10.	—	—	—	—	—	?	(+)	(+)	+	+	(++)	(++)	++	++		+++
		11.	—	—	—	—	?	(+)	(+)	+	+	+	(++)	(++)	++	++		+++
		12.	—	—	—	—	?	(+)	(+)	+	+	+	(++)	(++)	++	++		+++

eine geringe Wachstumsverzögerung, eine Erscheinung, die in den anderen Versuchen nicht mehr beobachtet wurde. Im übrigen erfolgt ein gutes Wachstum und eine entsprechende Atmungssteigerung. Die CO_2-Absorption durch KOH in Ruhe reicht allein somit nicht aus, um einen wirksamen CO_2-Mangel in den Versuchskulturen zu erreichen. Es muß der gasausschüttelnde Bewegungsfaktor dazukommen. Wie sich geraume Zeit nach Versuchsende erwies, waren die gehemmten „Bewegungskulturen mit KOH" nicht etwa abgestorben. Sie wuchsen zur optimalen Grenze nach, sobald man die Schüttelbewegung einstellte, verhielten sich von da an also wie die Ruhekulturen mit KOH.

Auch in den übrigen Reihenversuchen (16, 23, 27, 29) trat der CO_2-Mangeleffekt bei den „Bewegungskulturen mit KOH" klar zutage.

2. Mol/10 Asparaginsäure — 1% Glukose — Phosphatpuffer ($p_H = 7{,}2$).

In dieser dem ersten Medium ähnlichen Nährlösung beobachteten wir dieselbe Vermehrungshemmung bei CO_2-Abwesenheit (Versuche 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36), auch dann, wenn wir den Phosphatpuffer wegließen und durch 0,9% NaCl ersetzten (Versuch 25, 26). In den letzteren beiden Fällen war allerdings die Vermehrungsintensität geringer als in dem pufferhaltigen Medium.

3. „KNIGHT-Medium".

Nicht nur im *Aminosäuren-Salzgemisch* (Versuch 37) allein, sondern auch im vollständigen „KNIGHT-*Medium*" Versuche 38, 39, 40, 41, 43, 44, 45, 52, 54, 55) stellten wir das Fehlen jeglichen Wachstums und jeglicher Atmung, oder wenigstens eine stundenlange Verzögerung im Eintritt beider fest, sobald wir in den betreffenden Kulturen die CO_2 entfernten. Es kam dieser Effekt noch schöner zum Ausdruck als bisher, da vergleichsweise die nicht gehemmten Kulturen in dem an sich so günstigen Milieu ein optimaleres Wachstum aufwiesen als die entsprechenden Kulturen in den früheren einfachen Asparagin- (Säure-) Medien. Auch die Anlieferung eines Dipeptids in Form eines *Zusatzes von Glycyl-glycin* zum KNIGHT-Medium änderte nichts am Auftreten der Wachstumshemmung bzw. -verzögerung (Versuch 42). In Versuch 38 (s. Tabelle 2) haben wir ein typisches Beispiel vor uns.

Versuch 38. Kolibakterienstamm H_4. Nähragarschrägröhrchen. Eine 14stündige Passage durch „KNIGHT-Medium". Herstellung der Gesamtversuchskultur durch Übertragung von 4 Tropfen dieser 14stündigen Passagekultur auf 40 ccm KNIGHT-Medium. Keimzahl in 1 ccm $= 1548 \cdot 10^7$. Schüttelgeschwindigkeit: 100/Min. 37,5° C. Zur CO_2-Absorption: 0,2 ccm 33% KOH. Einzelkulturmenge: 2 ccm.

Wir haben alle durchgeführten Reihenversuche in einer Übersicht zusammengefaßt (Tabelle 3). Dabei sind nur solche Versuche berücksichtigt, in denen die „übliche" Kulturmenge von 2 ccm angewandt wurde.

Tabelle 2. *Versuch 38. Kolibakterien im „Knight-Medium“.*
Sonstiges siehe Tabelle 1.

Bewegte Versuchskulturen von 2 ccm		30 Min.	1 Std.	1½ Std.	2 Std.	2½ Std.	3 Std.	3½ Std.	4 Std.	4½ Std.	5 Std.	5½ Std.	6 Std.	6½ Std.	7 Std.	7½ Std.	8 Std.	8½ Std.	↓	24 Std.
mit KOH	1.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—
		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—
	2.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—
		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—
	3.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—
		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—
	4.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—
		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—
	5.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—
		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—
	6.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—
		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—
ohne KOH	7.	—	—	—	—	(+)	+	+	(++)	(++)	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
	8.	—	—	—	—	(+)	+	+	(++)	(++)	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
	9.	—	—	—	—	(+)	+	+	(++)	(++)	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
	10.	—	-	—	—	(+)	+	+	(++)	(++)	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
	11.	—	—	—	—	(+)	+	+	(++)	(++)	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
	12.	-	—	—	—	(+)	+	+	(++)	(++)	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
Brutschrankkontrollen in Ruhe und ohne KHO		—	—	—	—	(+)	(+)	+	(++)	(++)	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
		—	—	—	—	(+)	(+)	+	(++)	(++)	++	+++	+++	+++	+++	++	+ ++	+++		+++
		—	—	—	—	(+)	(+)	+	(++)	(++)	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++

Tabelle 3. *Bact. coli. Atmungs- und Wachstums-*

$\overset{O}{O}$ Völliges Fehlen von Atmungssteigerung und Vermehrung während der
Alle Kulturen zeigen verzögerte Atmungssteigerung bzw. Vermehrung, $\overset{O}{A}$, $\overset{O}{V}$,
(bzw. beide verzögert),

		Mol/10 Asparagin — 1 % Glukose in Mol/15 Phosphatpuffer											Mol/15 Asparaginsäure — 1 % Glukose in Mol/15 Phosphatpuffer						
Versuch Nr. →		14	15	16	19	20	21	22	23	24	27	29	30	31	32	33	34	35	36
mit KOH	Bewegung	O	O	O	A	(A)	$\overset{O}{A}$	(A)	O	O	O	(A)	O	O	$\overset{O}{(A)}$	O	O	O	O
		O	O	O	V	(V)	$\overset{O}{V}$	(V)	O	O	O	(V)	O	O	$\overset{O}{(V)}$	O	O	O	O
	Ruhe		A		A	A	A	A		(A)									
			V		V	V	V	V		(V)									
ohne KOH	Bewegung		V	V			V	V	V	V		V	V	O	(V)	V	V	V	V
	Ruhe	V	V	V	V	V	V	V		V		V	V	V	V	V	V	V	V
Einsaat: Keimzahl je 1 ccm		1168 $\times 10^5$	2608 $\times 10^5$	2544 $\times 10^6$	1232 $\times 10^7$	2528 $\times 10^6$	1316 $\times 10^7$	1312 $\times 10^7$		1260 $\times 10^6$	1344 $\times 10^7$	1048 $\times 10^7$	915 $\times 10^7$	1013 $\times 10^7$	1328 $\times 10^6$	1372 $\times 10^7$	1080 $\times 10^7$	2880 $\times 10^7$	2000 $\times 10^7$
Beobachtungs- und Schütteldauer in Stunden		24	7	7	7	7	6	$5^1/_2$	$6^1/_2$	7	8	10	$8^1/_2$	9	$8^1/_2$	9	$8^1/_2$	$7^1/_2$	$7^1/_2$

Die Zusammenstellung der Reihenversuche zeigt klar, daß in der weitaus überwiegenden Anzahl die Wachstums- und Atmungshemmung durch CO_2-Abwesenheit oder -Mangel in Erscheinung tritt. Die Einsaaten fallen durch ihre Größe ebenfalls auf. Sie liegen durchaus nahe an der Grenze, oberhalb der, wie weiter unten näher ausgeführt wird, der CO_2-Mangeleffekt nicht mehr zustande kommt. Nur in einzelnen der in der Tabelle 3 aufgeführten Versuche blieb ein Nachwachsen der gehemmten Kulturen nach Versuchsende aus. Die Kulturen waren also nicht tot. Ein noch eindeutigeres Bild ergibt sich, wenn nicht nur die Reihenversuche allein, sondern innerhalb der „Bewegungskulturen mit KOH" selbst die Einzelversuche untereinander verglichen werden. Dann zeigt sich die erstaunliche Tatsache, daß bei CO_2-Mangel bzw. -Abwesenheit 32 gewachsenen (*einschließlich* der mit Verzögerung gewachsenen) Kulturen 96 während der Versuchszeit *völlig* gehemmte gegenüberstehen.

Ergebnis. Bei Anwendung der üblichen Versuchstechnik zur manometrischen Messung des O_2-Verbrauches von Kolibakterien in syn-

versuche in der BARCROFT-WARBURG-*Apparatur.*

Schüttelzeit. A Atmungssteigerung. V sichtbare Vermehrung. (A) bzw. (V) bzw. $\overset{O}{(A)}$, $\overset{O}{(V)}$ nur ein Teil der Kulturen zeigt Atmungssteigerung oder Vermehrung, der andere Teil nicht.

„KNIGHT-Medium"															Nährbouillon		
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	55	56	14	17	18
O	O	(A)	O	O	O (A)	O (A)	O A	O	(A)	(A)	O	O	O	O	A	A	A
O	O	(V)	O	O	O (V)	O (V)	O V	O	(V)	(V)	O	O	O	O	V	V	V
																V	V
V	V	V	V	V	V	V	V	V					V	V		V	V
V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V		V
2048×10^7	1548×10^7	5140×10^7	464×10^7	514×10^7	1557×10^7	2192×10^6	1996×10^6	2668×10^6	904×10^6	1728×10^6	1388×10^6	1056×10^6	3720×10^7	1244×10^6	1168×10^5	3276×10^7	2356×10^7
$10^1/_2$	$8^1/_2$	$7^1/_2$	9	12	8	$7^1/_2$	$8^1/_2$	9	8	8	$10^1/_2$	9	9	$8^1/_2$	$7^1/_2$	$5^1/_2$	$5^1/_2$

thetischen Nährböden Asparagin(-säure)-Glukose-Phosphatpuffer, KNIGHT-Medium mit der BARCROFT-WARBURG-Methode, d. h. bei CO_2-Absorption durch KOH tritt in der weitaus überwiegenden Zahl der Fälle während der Schütteldauer eine völlige Wachstums- und Atmungshemmung bzw. -verzögerung auf. Die Ursache dieses Wachstumsmangels ist nicht in der Schüttelbewegung selbst, wohl aber in Verbindung derselben mit der gleichzeitigen CO_2-Absorption durch KOH zu suchen. Die Kulturen selbst sind nicht tot, sondern wachsen nach Aufhören der Schüttelbewegung nach. Eingetretenes Wachstum läßt sich durch weitere CO_2-Absorption und Schüttelbewegung nicht mehr aufhalten.

B. Der Einfluß von Nährbouillon und Pepton auf die Wachstumshemmung durch CO_2-Mangel.

1. Bouillon bzw. bouillonhaltige Nährlösungen ($p_H = 7{,}2$).

Zur Klärung der Frage, ob außerhalb des synthetischen Nährmediums selbst für den Hemmungseffekt ein Fehler in der Versuchs-

technik verantwortlich zu machen sei, prüften wir in den Reihenversuchen 14, 17 und 18 das Wachstum der Kolibakterien auf der gewöhnlichen Nährbouillon bei $p_H = 7{,}2$. Nicht nur rasche Trübungszunahme, sondern auch optimale Atmung stellten sich bei den „Bewegungskulturen mit KOH" ein.

Wir setzten nun in den Versuchen 43 (mit 2 ccm) sowie 52, 53 und 54 (mit je 1 ccm Versuchskultur) dem „KNIGHT-Medium" *Bouillonkonzentrationen* von 1 : 50, 1 : 100 und 1 : 200 hinzu. In Tabelle 4 und Abb. 1 ist ein solcher Versuch (54) wiedergegeben.

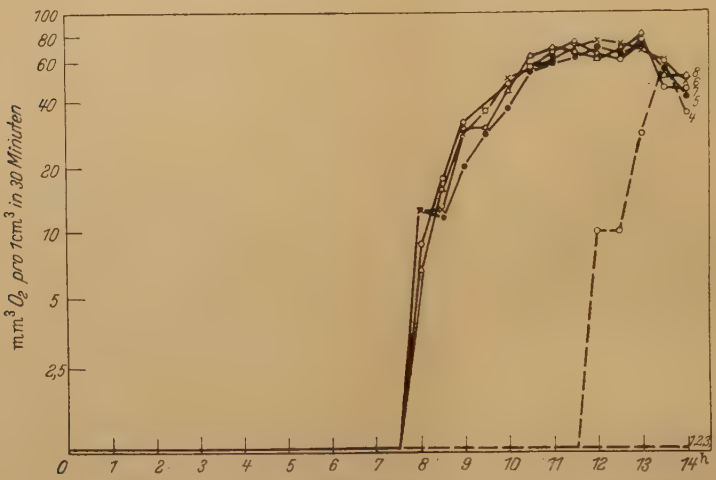


Abb. 1. Siehe Tabelle 4. *1, 2, 3, 4*: ohne Nährbouillon. *5, 6, 7, 8*: mit Nährbouillon 1 : 200.

Versuch 54. Kolibakterienstamm H_5. Endoagarplatte. Abschwemmung einer 15stündigen Nähragarschrägkultur und 3malige Waschung auf der Zentrifuge mittels Mol/15 Phosphatpuffer ($p_H = 7{,}2$), und Wiederaufschwemmung zum Trübungsgrade (++). Herstellung einer Gesamtkultur (1) durch Übertragung von 1 Tropfen der (++)-Aufschwemmung in 40 ccm „KNIGHT-Medium". Vier von den Atmungsgefäßen werden mit je 1 ccm einer Versuchskultur beschickt, die 0,5% Bouillon enthält (9,95 ccm der Kultur (1) + 0,05 ccm Bouillon), die anderen 7 Gefäße mit je 1 ccm einer Versuchskultur, die die entsprechende Menge Mol/15 Phosphatpuffer (9,95 der Kultur (1) + 0,05 ccm Phosphatpuffer) enthält. Keimzahl in 1 ccm = $1360 \cdot 10^6$. Schüttelgeschwindigkeit: 100/Min. 37,5° C. CO_2-Absorption: 0,2 ccm 33% KOH.

Dabei stellten wir ein Ausbleiben der Wachstumshemmung durch CO_2-Mangel fest.

Die noch gut wirksame Konzentration von *0,5%* entspricht z. B. einem Gehalt von 0,05 ccm Bouillon in 10 ccm KNIGHT-Medium. Wir bewegen uns damit in jenen Grenzen von Bouillonübertragungen, wie sie oft bei Beimpfung von synthetischen Versuchsmedien aus Bouillonkulturen erfolgen.

Es wäre also nicht verwunderlich, wenn der CO_2-Mangeleffekt in einem unserer früheren Versuche (s. Tabelle 3, Nr. 19) nur deshalb ausblieb, weil wir als Einsaat zwei große Tropfen Koli-Bouillonkultur auf 15 ccm Asparagin-Glukose-Phosphatpuffer übertrugen, wenngleich auch die ziemlich hohe Einsaat berücksichtigt werden muß.

2. Peptonhaltige Nährlösungen ($p_H = 7{,}2$).

Die Frage, welche der komplexen, undefinierten Bestandteile der Nährbouillon an dieser Verhütung der Wachstumshemmung durch CO_2-Mangel Anteil hat, veranlaßte uns, dem einfachen *Asparagin (bzw. -säure)-Glukose-Phosphatpuffer* ($p_H = 7{,}2$) *Peptonzusätze* beizugeben, um deren Einfluß zu prüfen. Wir untersuchten Witte-*Pepton* in Konzentrationen 1 : 200, 1 : 400, 1 : 800, 1 : 1600, 1 : 3200, 1 : 6400, 1 : 12800, 1 : 25600, 1 : 51200 und 1 : 102400 (Versuche 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34), wobei gleichzeitig als Kontrolle die in Tabelle 3 mit angeführten „Bewegungskulturen mit KOH" ohne Zusatz mitliefen. Dabei ergab sich, daß eine Peptonkonzentration von 1 : 25600 noch sehr gut imstande ist, den CO_2-Hemmungseffekt zu verhindern. Dies ist im nachfolgenden Versuchsbeispiel 33 (Tabelle 5 und Abb. 2) gut zu erkennen.

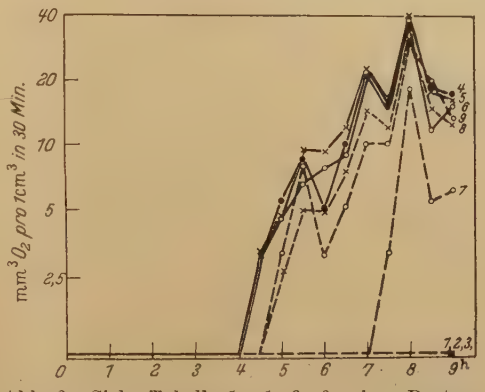


Abb. 2. Siehe Tabelle 5. *1, 2, 3*: ohne Pepton, *4, 5, 6*: mit Pepton 1 : 12800; *7, 8, 9*: mit Pepton 1 : 25600.

Versuch 33. Kolibakterienstamm H_3 · Blutagarplatte. 4 Passagen (34, 14, 30, $14^1/_2$ Stunden) in Mol/10 Asparaginsäure — 1% Glukose — Mol/15 Phosphatpuffer, $p_H = 7{,}2$). Übertragung von 4 Tropfen der $14^1/_2$stündigen Passagekultur auf 30 ccm Nährlösung = Kultur 1. Herstellung der Versuchskulturen mit Peptonzusatz von 1 : 12800 und 1 : 25600 (7,5 ccm Kultur 1. + 0,5 ccm Pepton-Phosphatpuffer ($p_H = 7{,}2$) 1 : 800 und 1 : 1600) und der Versuchskulturen mit entsprechendem Zusatz von Phosphatpuffer ($p_H = 7{,}2$). Keimzahl in 1 ccm $= 1372 \cdot 10^7$. Schüttelgeschwindigkeit 100/Min. 37,5° C. CO_2-Absorption: 0,2 ccm 33% KOH. Einzelkulturmenge: 2 ccm.

Dabei ist zu beachten, daß die für einfache Medien charakteristische, langsame Vermehrung und der entsprechend niedrige Verlauf der O_2-Verbrauchskurve trotz Peptonzusatz beibehalten wird.

Im Knight-*Medium* wurden in den Versuchen 55, 56 Peptonkonzentrationen von 1 : 20000, 1 : 10000 untersucht, ohne daß eine Durchbrechung des CO_2-Mangeleffektes auftrat.

Tabelle 4. *Versuch 54. Kolibakterien im*

Sonstiges siehe

Bewegte Versuchskulturen von 1 ccm³			30 Min.	1 Std.	1½ Std.	2 Std.	2½ Std.	3 Std.	3½ Std.	4 Std.	4½ Std.	5 Std.	5½ Std.	6 Std.	6½ Std.
mit KOH	0,5% Bouillon	1.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		2.	—	—	—	—	—	—	-	—	—	-	—	—	—
		3.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		4.	—	—	—	—	—	-	—	—	—	—	—	—	—
		5.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		6.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		7.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		8.	—	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—	—
ohne KOH		9.	—	—	—	—	—	—	(+)	(+)	+	(++)	++	++	++
		10.	—	—	—	—	—	?	(+)	(+)	+	(++)	++	++	++
		11.	—	-	—	—	—	?	(+)	(+)	+	(++)	++	++	++
Brutschrank-kontrollen in Ruhe und ohne KOH			—	—	—	—	?	?	(+)	+	+	(++)	++	++	++
		0,5 %	—	—	—	—	(+)	+	+	(++)	(++)	++	++	+++	+++

Ergebnis. Bei Verwendung reiner Nährbouillon bzw. in bouillon- oder peptonhaltigen synthetischen Nährlösungen (Asparagin-(säure)-Glukose-Phosphatpuffer ($p_H = 7{,}2$, KNIGHT-Medium) wird die durch CO_2-Abwesenheit bedingte Wachstumshemmung verhindert. In Asparagin--säure-Glukose-Phosphatpuffer sind noch Peptonzusätze bis zu 1 : 25600, wirksam. Im KNIGHT-Medium besitzen Bouillonzusätze bis zu 1 : 200 eine wachstumseinleitende Wirkung.

C. Die Abhängigkeit des CO_2-Mangeleffektes vom Verhältnis der CO_2-Bildung zur CO_2-Abgasung.

Die Konzentration der in der Versuchskultur enthaltenen CO_2 hängt für unsere Versuchsmethodik von zwei Faktoren ab:

1. Von dem bakteriellen Faktor der *CO_2-Produktion.*
2. Von dem physikalischen Faktor der *CO_2-Abgasung.*

Die CO_2-Produktion wird bestimmt von der Anzahl der lebenden, CO_2-bildenden Keime, d. h. also der „wirklichen" Einsaat, sowie deren Vermehrungsintensität und Produktionskraft. Die CO_2-Abgasung richtet sich — Temperatur- und p_H-Konstanz vorausgesetzt — nach der Konzentration der über der Lösung stehenden Kohlensäure, nach dem Verhältnis von *Oberfläche* zur *Kulturschichtdicke*, somit also auch nach Gefäßgröße und -form, weiterhin nach der *Frequenz* und der *Schwingungsweite der Schüttelbewegungen.* Bei Gleichhaltung der physika-

„Knight-*Medium*“. *Zusatz von Nährbouillon.*
unter Tabelle 1.

7 Std.	$7^1/_2$ Std.	8 Std.	$8^1/_2$ Std.	9 Std.	$9^1/_2$ Std.	10 Std.	$10^1/_2$ Std.	11 Std.	$11^1/_2$ Std.	12 Std.	$12^1/_2$ Std.	13 Std.	$13^1/_2$ Std.	14 Std.	↓	21 Std.
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	·	–	–	–	–		+++
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		+++
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		+++
–	–	–	–	–	–	–	–	–	(+)	+	(++)	++	+++	+++		+++
–	?	(+)	(+)	+	(++)	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
–	–	(+)	+	(++)	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
–	?	(+)	+	(++)	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
–	?	(+)	+	(++)	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++

lischen Faktoren, d. h. der Gefäßgröße, Kulturmenge, KOH-Menge, Schüttelfrequenz, Temperatur, Luftdruck und p_H-Gehalt ist es möglich, die Abhängigkeit unseres CO_2-Mangeleffektes von der Einsaatgröße zu prüfen, also eine Grenzeinsaat festzulegen. Bei Gleichbleiben der Einsaat und aller physikalischen Faktoren kann man ferner die Abhängigkeit unseres Effektes von der Kulturmenge prüfen. Nach diesen beiden Gesichtspunkten haben wir Versuche angestellt.

1. Der Einfluß der Einsaatgröße.

Um die „wirkliche“ Grenzeinsaat festzustellen, bei der unser CO_2-Phänomen gerade nicht mehr auftritt, müßten wir neben der absoluten Gleichhaltung aller physikalischen Faktoren eine immer gleichbleibende Wachstumsintensität und CO_2-Produktion bei unseren Bakterien voraussetzen, weiterhin aber auch durch ein absolut genaues Zählverfahren die Einsaatgröße einwandfrei definieren. Da der Keimzählung immer noch allerhand Mängel anhaften, weiterhin die bakterielle Vermehrungsfähigkeit und Stoffwechselleistung von Fall zu Fall wechselt, ist es, genau genommen, nur innerhalb eines Versuches selbst, allgemein gesehen also nur in ungefähren Grenzen möglich, die *Grenzeinsaat* festzulegen. Nach den Ergebnissen der Versuche 39, 40, 41 liegt diese bei etwa $1000 \cdot 10^7$ Keimen je 1 ccm, wobei wir darauf hinweisen müssen, daß darin infolge Verwendung von Abschwemmungen 19stündiger und

Tabelle 5. *Versuch 33. Kolibakterien in Mol/10 Asparaginsäure*
Sonstiges siehe

Bewegte Versuchskulturen von 2 ccm³			30 Min.	1 Std.	1½ Std.	2 Std.	2½ Std.	3 Std.	3½ Std.	4 Std.	4½ Std.
mit KOH		1.	—	—	—	—	—	—	—		
		2.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		3.	—	—	—	—	—	—	—	—	
	1 : 12800 Pepton	4.	—	—	—	—	(+)	(−)	+	+	+
		5.	—	—	—	—	(+)	(+)	+	+	+
		6.	—	—	—	—	(−)	(−)	+	+	+
	1 : 25600 Pepton	7.	—	—	—	—	—	(−)	+	+	+
		8.	—	—	—	—	—	(−)	+	+	+
		9.	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+
ohne KOH		10.	—	—	—	—	?	(+)	+	+	+
		11.	—	—	—	—	?	(+)	+	+	+
		12.	—	—	—	—	?	(+)	+	+	+
Brutschrank-kontrollen in Ruhe und ohne KOH		—	—	—	—	—	—	(+)	(+)	+	+
		—	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+
		1 : 12800	—	—	—	(+)	+	+	+	+	+
		1 : 25600	—	—	—	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+

Tabelle 6. *Versuch 40. Kolibakterien im* „KNIGHT-
Sonstiges siehe

Bewegte Versuchskulturen von 2 ccm			0 Min.	30 Min.	1 Std.	1½ Std.	2 Std.	2½ Std.	3 Std.	3½ Std.
mit KOH	464 · 10⁷	1.	—	—	—	—	—	—	—	—
		2.	—	—	—	—	—	—	—	—
		3.	—	—	—	—	—	—	—	—
	928 · 10⁷	4.	—	—	—	—	—	—	—	—
		5.	—	—	—	—	—	—	—	—
		6.	—	—	—	—	—	—	—	—
	1856 · 10⁷	7.	?	?	?	?	?	?	(+)	+
		8.	?	?	?	?	?	?	(+)	+
		9.	?	?	?	?	?	?	(+)	+
ohne KOH	464 · 10⁷	10.	—	—	—	—	—	?	(+)	(+)
		11.	—	—	—	—	—	?	(+)	(+)
		12.	—	—	—	—	—	?	(+)	(+)
Brutschrank-kontrollen in Ruhe und ohne KOH		464 · 10⁷	—	—	—	—	—	?	(+)	(+)
		464 · 10⁷	—	—	—	—	—	?	(+)	(+)
		928 · 10⁷	—	—	—	—	?	(+)	(+)	+
		1856 · 10⁷	?	?	?	?	(+)	(+)	+	+

— 1% Glukose — Mol/15 Phosphatpuffer. p_H = 7,2. Peptonzusätze.
unter Tabelle 1.

5 Std.	$5^1/_2$ Std.	6 Std.	$6^1/_2$ Std.	7 Std.	$7^1/_2$ Std.	8 Std.	$8^1/_2$ Std.	9 Std.	↓	13 Std.	↓	24 Std.
—	—	—	—	—	—	—	—	—		—		—
—	—	—	—	—	—	—	—	—		—		—
—	—	—	—	—	—	—	—	—		—		—
+	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	++		+++		+++
+	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	++	++	++		+++		+++
+	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	++	++	++		+++		+++
+	+	+	+	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)		+++		+++
+	+	+	+	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)		+++		+++
+	+	+	+	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)		+++		+++
+	+	+	+	+	(++)	(++)	(++)	(++)		+++		+++
+	+	+	+	+	(++)	(++)	(++)	(++)		+++		+++
+	+	+	+	+	(++)	(++)	(++)	(++)		+++		+++
+	+	+	+	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)		+++		+++
+	+	+	+	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)		+++		+++
(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	++	++		+++		+++
+	+	+	+	+	(++)	(++)	(++)	(++)		+++		+++

Medium" bei verschiedenen Einsaaten (Keimzahl je 1 ccm).
unter Tabelle 1.

4 Std.	$4^1/_2$ Std.	5 Std.	$5^1/_2$ Std.	6 Std.	$6^1/_2$ Std.	7 Std.	$7^1/_2$ Std.	8 Std.	$8^1/_2$ Std.	9 Std.	↓	24 Std.
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		+++
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		+++
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		+++
—	—	—	—	—	(+)	+	+	+	(++)	++		+++
—	—	—	(+)	+	+	(++)	++	++	++	+++		+++
—	—	—	—	—	?	(+)	+	+	(++)	++		+++
+	(++)	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
+	(++)	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
+	(++)	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
+	(++)	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
+	(++)	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
+	(++)	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
+	+	(++)	(++)	++	++	++	++	+++	+++	+++		+++
+	+	(++)	(++)	++	++	++	++	+++	+++	+++		+++
+	(++)	(++)	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++		+++
(++)	(++)	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++		+++

22stündiger Nähragarschrägkulturen eine große Zahl von abgestorbenen Bakterienleibern enthalten sein wird. Ein praktisch fast ebenso verwendbares Kriterium ist die Tatsache, daß man sich gerade an der Sichtbarkeitsgrenze der beginnenden Trübung bewegt, so wie dies aus dem nachstehend angeführten Versuchsbeispiel 40 (Tabelle 6 und Abb. 3) hervorgeht.

Versuch 40. Kolibakterienstamm H_4 · Nähragarschrägröhrchen. Abschwemmung einer 19stündigen Nähragarschrägkultur und 3malige Waschung auf der Zentrifuge mit Mol/1 Phosphatpuffer ($p_H = 7{,}2$). Wiederaufschwemmung zum Trübungsgrad +++. Verdünnung zu einer 4 n-Versuchskultur im „KNIGHT-Medium" vom Trübungsgrade: ?. Keimzahl in 1 ccm $= 1856 \cdot 10^7$. Verdünnung der 4 n-Kultur zu Kulturen mit 2 n und n-Keimen im KNIGHT-Medium. Schüttelgeschwindigkeit = 100/Min. 37,5° C. CO_2-Absorption = 0,2 ccm 33% KOH. Einzelkulturmenge: 2 ccm.

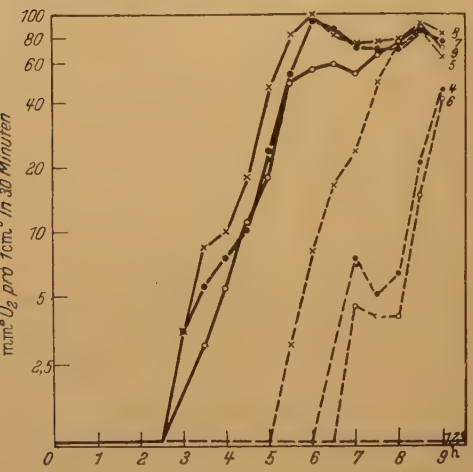


Abb. 3. Siehe Tabelle 6. *1, 2, 3*: $464 \cdot 10^7$ Keime je 1 ccm; *4, 5, 6*: $928 \cdot 10^7$ Keime je 1 ccm; *7, 8, 9*: $1856 \cdot 10^7$ Keime je 1 ccm.

Die Prüfung der Einsaatgrößen von Tabelle 3 zeigt, daß über die oben angegebene Zahl hinaus die allgemeine Grenzeinsaat bis an $2000 \cdot 10^7$ heranreichen kann.

Wir möchten aber gerade in diesem Zusammenhang nochmals betonen, daß durch verschiedenartigste Keimdichten derselben, sowie bei verschiedenen Füllungen der Zählkammer durch Agglutination der Keime untereinander, Verdünnungsfehler usw. die Möglichkeit zu fehlerhaften Keimzählungen so groß ist, daß die angegebenen Zahlen nur als ungefähre gelten können. Immerhin ändert dieser Unsicherheitsfaktor an der Tatsache der Grenzeinsaat nichts.

2. Der Einfluß der Kulturmenge.

Bei gleicher Einsaat und Gleichhaltung aller sonstigen physikalischen Momente läßt sich auch ein *Grenzvolumen* feststellen, bei dem der CO_2-Mangeleffekt nicht mehr zustande kommt. Für unsere kegelförmigen 15-ccm-Atmungsgefäße, wie sie üblicherweise verwendet werden, haben wir in mehreren Versuchen (44, 45, 46, 47, 48, 49) diese Grenze kennzeichnen können. Wir fanden in allen unseren Versuchen, daß eine Versuchskultur von 3 ccm eine Vermehrung in den „Bewegungskulturen ohne KOH" zuläßt. Bei einer 2-ccm-Menge stellt sich jenes

Zwischenbild ein, wie es aus Tabelle 3 hervorgeht, d. h. also mehr Versager als wachsende Kulturen. Eine Kulturmenge von 1 ccm bringt noch viel mehr jene ungünstigen Vorbedingungen mit, die eine besonders intensive CO_2-Entlüftung erlauben, d. h. das Verhältnis noch eindeutiger zugunsten der Oberfläche verschieben. Diese 1-ccm-Grenze kommt besonders in Versuch 44 und gleicherweise in dem Versuch 45 (Tabelle 7 und Abb. 4) zum Ausdruck.

Versuch 45. Kolibakterienstamm H_4. Nähragarschrägkultur. Abschwemmung einer 22stündigen Nähragarschrägkultur und 3malige Waschung mit Mol/15 Phosphatpuffer ($p_H = 7{,}2$). Wiederaufschwemmung zum Trübungsgrade (++.) Herstellung der Gesamtversuchskultur durch Übertragung von 2 Tropfen der (++)-Aufschwemmung in 40 ccm „KNIGHT-Medium". Keimzahl in 1 ccm = $1996 \cdot 10^6$. Schüttelgeschwindigkeit: 100/Min. 37,5° · CO_2-Absorption durch 0,2 ccm 33% KOH.

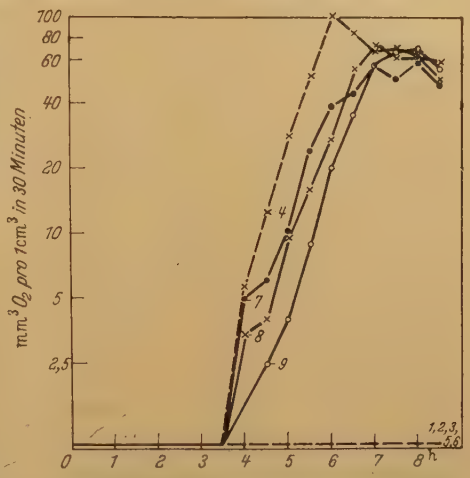


Abb. 4. Siehe Tabelle 7. *1, 2, 3*: 1 ccm Kulturvolumen; *4, 5, 6*: 2 ccm Kulturvolumen: *7, 8, 9*: 3 ccm Kulturvolumen.

Nicht, daß diese 1 ccm-Grenze als eine für alle Fälle zutreffende anzusehen ist. Wir haben ja schon den Einfluß der Grenzeinsaat und der Änderungen der sonstigen physikalischen Komponenten gekennzeichnet. Auch erlebten wir es in zwei mit anderen Zielen durchgeführten Versuchen (Versuche 52 und 53), daß in 1-ccm-Kulturmengen nur ein partieller CO_2-Mangeleffekt zustande kam. Doch ist die 1-ccm-Menge noch mehr als die 2-ccm-Grenze imstande, bei CO_2-Mangel das Wachstum zu verhindern.

Ergebnis. Für das Zustandekommen der Wachstumshemmung durch CO_2-Mangel spielt auch das Verhältnis von CO_2-Produktion und CO_2-Abgasung eine Rolle. Die CO_2-Bildung richtet sich nach der wirklichen Einsaat, d. h. der Anzahl lebender, CO_2-bildender Keime. Bei Gleichhaltung der physikalischen Faktoren wird von einer bestimmten Grenzeinsaat an (etwa $1000—2000 \cdot 10^7$ Keime je 1 ccm) der CO_2-Mangeleffekt verhütet. Bei konstanter Einsaat wiederum läßt sich die Abhängigkeit des Hemmungseffektes von dem Kulturvolumen zeigen. Das Grenzvolumen, bei dem ein Wachstum trotz CO_2-Mangel zustande kommt, liegt in unserer Versuchsanordnung bei 3 ccm. Unterhalb desselben tritt in den meisten Fällen Wachstumshemmung ein.

Tabelle 7. *Versuch 45. Kolibakterien im „*KNIGHT-Sonstiges siehe

Bewegte Versuchskulturen			30 Min.	1 Std.	1½ Std.	2 Std.	2½ Std.	3 Std.	3½ Std.	4 Std.
mit KOH	1 ccm	1.	—	—	—	—	—	—	—	–
		2.	—	—	—	—	—	—	—	—
		3.	—	—	—	—	—	—	—	—
	2 ccm	4.	—	—	—	—	-	(+)	(+)	+
		5.	—	—	—	—	—	—	–	—
		6.	—	—	—	—	—	—	—	—
	3 ccm	7.	—	—	—	—	—	(+)	+	+
		8.	—	—	—	—	—	—	—	(+)
		9.	—	—	—	—	—	—	—	—
ohne KOH	2 ccm	10.	—	—	—	—	—	(+)	+	+
		11.	—	—	—	—	–	(+)	+	+
		12.	—	—	—	—	—	(+)	+	+
Brutschrank-kontrollen in Ruhe und ohne KOH		1 ccm	—	—	—	—	—	(+)	(+)	+
		2 ccm	—	—	—	—	—	(+)	(+)	+
		3 ccm	—	—	—	—	—	(+)	(+)	+

Besprechung.

Die Atmungs- und Wachstumshemmung von Kolibakterien durch CO_2-Mangel in synthetischen, definierten Nährmedien (Asparagin (bzw. -säure)-Glukose-Phosphatpuffer, KNIGHT-Medium) während der manometrischen O_2-Messung nach BARCROFT-WARBURG soll unter vier Gesichtspunkten betrachtet werden:

I. Welche Versuchsbedingungen müssen eingehalten werden, um ein methodisch einwandfreies Wachstum in der BARCROFT-WARBURG-*Apparatur zu ermöglichen?*

Die BARCROFT-WARBURG-Methode ist an sich bestimmt zur Messung des Gasstoffwechsels von Gewebszellen oder solchen Einzelorganismen, die auch bei CO_2-Entzug zu wachsen vermögen. Bei der Erweiterung ihrer Anwendung auf die Bakterien mußte also damit gerechnet werden, daß die Abgasung der CO_2 aus der Versuchskultur durch Schütteln und die Absorption durch KOH solche Bakterien traf, die eine bestimmte CO_2-Spannung in dem sie umgebenden Kulturmedium benötigen. Der methodische Aufbau der BARCROFT-WARBURG-Methode entspricht in der Tat einer Anordnung, die CO_2 genau so entzieht, wie das z. B. auf ganz andere Weise wirkende System von WALKER (1932), der durch Einleitung eines CO_2-freien Luftstromes eine völlige CO_2-Entfernung

Medium". *Verschiedene Mengen von Versuchskulturen.*
unter Tabelle 1.

$4^1/_2$ Std.	5 Std.	$5^1/_2$ Std.	6 Std.	$6^1/_2$ Std.	7 Std.	$7^1/_2$ Std.	8 Std.	$8^1/_2$ Std.		22 Std.
-	—	—	—	—	—	—	—	–		+ + +
—	—	—	—	–	—	—	—	—		+ + +
.	—	—	—	—	—	—	—	-		+ + +
(+)	(+ +)	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +		+ + +
.	—	—	—	–	—	—	—	—		+ + +
—	—	—	—	.	—	—	—	—		+ + +
+	(+ +)	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +		+ + +
(+)	+	(+ +)	+ +	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +		+ + +
( )	+	+	(+ +)	(+ +)	+ +	+ + +	+ + +	+ + +		+ + +
(+ +)	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +		+ + +
(+ +)	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +		+ + +
(+ +)	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +		+ + +
+	(+ +)	(+ +)	+ +	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +		+ + +
+	(+ +)	(+ +)	+ +	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +		+ + +
+	(+ +)	(+ +)	+ +	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +		+ + +

aus der Nährflüssigkeit erreichte. Bei Atmungsversuchen an Gewebsschnitten oder Bakterien in komplexen bouillon- und peptonhaltigen Lösungen oder bei hohen Bakterieneinsaaten hat der CO_2-Entzug keine nachteiligen Folgen. Sie enthalten in genügender Menge solche Stoffe, die offenbar die CO_2-Abwesenheit kompensieren. Sofern wir aber darauf achten, daß in unseren Versuchen entweder durch Passagen im gewählten synthetischen Medium oder durch Waschen der Ausgangskulturen auf der Zentrifuge eine „Verunreinigung" der Versuchskulturen mit wachstumsfördernden Stoffen vermieden wird, kann es zu der von uns beobachteten Wachstumshemmung durch CO_2-Abwesenheit kommen. Um diesen **CO_2-Mangeleffekt**, sowie eine **Akzeleratorwirkung** zu vermeiden, müssen wir also drei Versuchsmomente berücksichtigen:

1. Keine Überführung von Nährbouillon oder Pepton aus der Ausgangskultur in die Versuchskultur.

Die von uns geprüfte wachstumseinleitende Grenzkonzentration von z. B. 0,05 ccm Bouillon auf 10 ccm KNIGHT-Medium wird unter den Versuchsbedingungen durchaus erreicht, besonders wenn wir nur dünn gewachsene Kolibouillonkulturen zur Einsaat benutzen. Der darin enthaltene Peptonanteil beträgt etwa 1 : 20000, ohne daß wir näher

eingehen auf die wahrscheinlich noch wirksameren Fleischsubstanzen. Damit bewegen wir uns auch an der Grenze der Peptonkonzentration (1 : 25600), die in unseren Versuchen in Asparaginsäure-Glukose-Phosphatpuffer ($p_H = 7{,}2$) noch den CO_2-Mangeleffekt unterdrückt.

2. Beachtung der Grenzeinsaat.

Es ist eine bekannte Tatsache, daß besonders in synthetischen Nährlösungen kleine Einsaaten nicht oder sehr spät „angehen". Sollte die Ursache darin liegen, daß in der großen Flüssigkeitsmenge die von den Bakterien gebildete CO_2 durch Diffusion so stark verdünnt wird, daß es oft nicht zu einer ausreichenden CO_2-Konzentration in der nächsten Umgebung der Keime kommt? GLADSTONE, FILDES und RICHARDSON (1935) geben für junge Typhusbakterien an, daß mit der WALKERschen Methodik oberhalb $2000 \cdot 10^6$ ein Wachstum unter allen Umständen zustande kommt. Wir selbst fanden mit unserer Versuchsanordnung mit Kolibakterien eine Grenzeinsaat von $1000—2000 \cdot 10^7$, allerdings nicht als jung anzusprechender Organismen. Es empfiehlt sich also, für jede aerobe Bakterienart und jede Versuchsanordnung, in der eine CO_2-Absorption stattfindet, diese Grenzeinsaat zu bestimmen.

Nachdem die Folgen der Unterschreitung einer gewissen Grenzeinsaat klar geworden sind, muß auch die Frage geprüft werden, ob es ratsam ist, bei chemotherapeutischen Züchtungsversuchen den Umfang der überimpften Keimzahl unbedenklich zu steigern. Bekanntlich vergeht in einem stickstoffhaltigen Milieu bei kleineren Einsaaten eine gewisse Anlaufszeit, die sog. „lag phase", bis es endlich zu meßbaren Atmungsgrößen kommt. Nach großen Einsaaten kommt es gar nicht mehr zum Auftreten dieser Phase, meist befindet man sich schon in der Anstiegslinie des O_2-Verbrauchs, der sog. „logarithmischen Phase". Wir wiesen weiter darauf hin, daß die „wirkliche Einsaat" begleitet ist von toten Bakterienleibern, deren Zahl nur dann geringer ist, wenn wir zur Impfung der Versuchskultur eine Ausgangskultur benutzen, die sich gerade in der „logarithmischen Wachstumsphase" befindet. Große Einsaaten enthalten also mehr Bakterienleichen als kleine. Bei der Prüfung chemotherapeutisch wirksamer Stoffe in vitro auf Wachstum oder Atmung spielen diese toten Bakterienleiber eine wichtige Rolle, da sie sog. „Inhibitoren", d. h. Hemmungsstoffe der Sulfonamidwirkung enthalten.

Man gebraucht teilweise für alle Stoffe, welche die bakteriostatische Wirkung der Sulfonamide hemmen, den Ausdruck „Inhibitoren". Nach STAMP (1939) verhindert ein Zusatz von hitzeabgetöteten hämolytischen Streptokokken zu einer Kultur des homologen Stammes in sulfanilamidhaltiger Bouillon den bakteriostatischen Effekt. Eine hitzebeständige Fraktion hitzeabgetöteter Streptokokken ist wirksam bis zu Verdünnungen von 1 : 10000 bis 1 : 100000. Nach FLEMING, (1940) hemmen lebende und abgetötete Aufschwemmungen von Staphylokokken,

Bacterium Aertryke, Streptococcus viridans und Streptococcus pyogenes die Wirkung von Sulfanilamid.

Es ist also in chemotherapeutischen „in vitro"-Versuchen ratsam, nicht nur eine Grenzeinsaat nach unten zu beachten, um das Angehen der Kulturen überhaupt zu ermöglichen, sondern auch sich im Bereiche kleiner Einsaaten von möglichst frischem Bakterienimpfmaterial zu halten.

3. Wahl einer Kulturmenge, bei der trotz Entlüftung und Absorption eine genügend große CO_2-Konzentration in der Versuchskultur bestehen bleibt.

Natürlich läßt sich nur im Einzelfall und bei konstanter Einsaat eine Grenze angeben. Die Kulturmenge bei unserer Versuchsanordnung müßte oberhalb 2 ccm liegen. Es ist uns verständlich, warum Hirsch so gute O_2-Verbrauchskurven einstellen konnte. Er verwandte im allgemeinen Kulturmengen von 4 ccm in Versuchsgefäßen von 35—40 ccm (mit Bodendurchmesser von 55 mm), und besaß somit ein günstigeres Verhältnis des Kulturvolumens gegenüber der Abgasungsoberfläche.

II. Vergleich der wachstumseinleitenden Wirkung von Pepton und Bouillon auf „ruhende Bakterien" im Sinne Quastels *und auf das durch CO_2-Entzug gehemmte Bakterienwachstum.*

Wir haben an anderer Stelle darauf hingewiesen, daß Hirsch (1937) an „ruhenden Bakterien" im Sinne Quastels, d. h. also innerhalb eines stickstofffreien Mediums, die Wirkung abgestufter Peptonkonzentrationen nachweisen konnte.

Dabei machte er die Beobachtung, daß bei allen Zusätzen während der ersten halben Stunde die Anstiegsgeschwindigkeit der O_2-Verbrauchskurve die gleiche war. Von da an gingen die Kurven fächerförmig auseinander und erreichten auch verschieden hohe Vermehrungs-, d. h. Atmungsmaxima. Bei den niedrigeren Konzentrationen (0,062—0,125%) stellte sich nach $1^1/_2$ Stunden ein konstanter O_2-Verbrauch vom Typ der „Ruheatmung" im Sinne Quastels ein, bei der nächsthöheren Konzentration geschah dasselbe, nur etwas später. Die „Ruheatmungs"-Größen dieser „maximalen stationären Phase" nach Buchanan verhielten sich dabei genau (4: 2: 1) wie die zugesetzten Peptonkonzentrationen (0,25: 0,125 : 0,062%).

Aus seinen Versuchen ist abzuleiten, daß steigende Peptonzusätze immer höhere Optima und Steigerungen von Vermehrung und O_2-Verbrauch liefern. Pepton erfüllt also die beiden Aufgaben, sowohl Eiweißbausteine (Vermehrungsoptimum) als auch wachstumsbeschleunigende Faktoren, sog. „growth stimulants" (Vermehrungsgeschwindigkeit) zur Verfügung zu stellen. Es war nun anzunehmen, daß bei geringeren Peptonkonzentrationen als 0,062% immer noch genügend Faktoren vorhanden sein könnten, um zwar nicht mehr als „growth stimulants",

wohl aber noch als „*wachstumseinleitende Faktoren*“ zu wirken, falls für das Vorhandensein von assimilierbaren N-Substanzen gesorgt wurde. In der Tat haben wir an unseren durch CO_2-Mangel im Wachstum gehemmten Kolibakterien zeigen können, daß im Asparagin-Glukose-Phosphatpuffermedium noch eine Peptonkonzentration von 1 : 25600 den CO_2-Mangeleffekt zu verhüten vermag. Wenn dabei der langsame, niedrige und unregelmäßige Vermehrungs- und Atmungstyp, wie er in solchen einfachsten Medien üblich ist, beibehalten wird, so ist dies daraus zu erklären, daß mit dem niedrigen Peptonzusatz wohl noch „wachstumseinleitende Faktoren“, nicht aber genügend große Mengen leicht assimilierbarer Eiweißbausteine beigegeben wurden. Setzt man bei Atmungsversuchen in der BARCROFT-WARBURG-Apparatur zu einfachsten, synthetischen Medien Pepton oder Nährbouillon in größerer Menge zu, dann zeigt sich nicht nur ein Einfluß auf die optimale Bakterienernte oder die Atmungssteigerung bzw. Vermehrungsgeschwindigkeit, auch die Stetigkeit der Vermehrungs- bzw. Atmungszunahme wird günstig beeinflußt. Die O_2-Verbrauchskurven besitzen einen gleichmäßigeren Verlauf als solche, die in ganz einfachen Nährmedien gewonnen wurden. In den nicht optimalen Lösungen (Asparagin bzw. -säure-Glukose-Phosphatpuffer) kam es, falls trotz CO_2-Entziehung ein Wachstum auftrat, zu Periodizitäten in der Atmungssteigerung, die man gelegentlich auch von günstigeren Medien her kennt, vielleicht noch verstärkt durch den weiterhin wirksamen CO_2-Entzug. Bei den großen Kulturmengen (4 ccm), die HIRSCH anwandte, und die einen wirksamen CO_2-Entzug durch die BARCROFT-WARBURG-Methode verhinderten, gewährleistete die noch genügend anwesende CO_2 einen viel regelmäßigeren Wachstums- und Atmungsverlauf und sogar optimalere Bakterienernten. Man hat also den Eindruck, als verstärke eine dauernde CO_2-Entziehung die schon normal vorhandenen Periodizitäten in der Atmungssteigerung. Auffallend ist auch, daß die unter Sulfonamidwirkung stehenden Versuchskulturen (s. HIRSCH 1941/42) im Gegensatz zu den unbehandelten Kontrollkulturen ebensolche hin- und herzackenden Atmungskurven liefern.

Die Hemmung des bakteriellen Wachstums durch Kohlensäureentzug innerhalb eines stickstoffhaltigen synthetischen Nährmediums bietet somit eine Möglichkeit, den „wachstumseinleitenden Charakter“ von Pepton noch in Verdünnungen nachzuweisen, die bei der Prüfung an „ruhenden Bakterien“ (im Sinne QUASTELS) schon unwirksam sind. Damit kann auch die Zahl der Wirkungsmöglichkeiten bei der Wachstumseinleitung durch Peptone eingeengt werden. Zu denken ist an einen steigernden Einfluß auf die CO_2-Produktion der Einsaat, wodurch die „lag phase“ abgekürzt bzw. der CO_2-Entzug durch die BARCROFT-WARBURG-Methode überwunden wird.

Mit dieser wachstumseinleitenden Wirkung von Pepton und Bouillon an „durch CO_2-Entzug gehemmten Bakterien" muß man ihren antibakteriostatischen Effekt gegenüber der Sulfonamidwirkung sowie ihre „Akzelerator"-Wirkung an wachsenden Kulturen vergleichen.

Nach Lockwood (1938) wird die bakteriostatische Sulfonamidwirkung gegenüber Streptokokken in Serum durch die Gegenwart kleiner Peptonmengen aufgehoben. Der Zusatz von Pepton soll sozusagen einen Überschuß von leicht assimilierbarem Stickstoff zur Verfügung stellen und damit die Vermehrung in Gang bringen. Kolibakterien bleiben nach Nitti, Bovet und Depierre (1937) in gewöhnlicher Bouillonkultur von Sulfanilamid 1:1000 unbeeinflußt. Solche Beobachtungen wurden auch in Peptonwasserkulturen gemacht. In den üblichen Fleischwasser-Pepton-Nährböden sind solche „Inhibitoren" reichlich enthalten, wodurch diese Medien wenig geeignet erscheinen zur bakteriostatischen Prüfung von Sulfonamiden. Durch den wechselnden Gehalt an „Inhibitoren" sind somit auch die widersprechenden Ergebnisse in Pepton- und Fleischwassermedien zu erklären. Peptone und Fleischwassersubstanzen sind aber nicht nur „Inhibitoren" der Sulfanilamidwirkung, sondern auch „Akzeleratoren", d. h. sie zeigen an wachsenden unbehandelten Kulturen eine vermehrungsbeschleunigende Wirkung. „Inhibitor"-Wirkung und „Akzelerator"-Wirkung kann bei Peptonen und Bouillonsubstanzen sehr wohl im Grunde identisch sein.

Die Peptone und Bouillonsubstanzen besitzen somit vier Eigenschaften:

1. Sie wirken wachstumseinleitend auf „ruhende Bakterien" im Sinne Quastels.
2. Sie leiten das Wachstum ein bei infolge CO_2-Mangel wachstumsgehemmten Bakterien.
3. Sie wirken wachstumsbeschleunigend auf schon in der Vermehrung befindliche Bakterien.
4. Sie heben den wachstumshemmenden Effekt der Sulfonamide auf.

Die Wirkungsweise der Pepton- und Bouillonsubstanzen können wir dabei im einzelnen vorläufig noch nicht erklären. Vielleicht spielt für die Inhibitorwirkung eine ähnlich antagonistische Substanz wie die p-Aminobenzoesäure eine Rolle, vielleicht ist eine solche auch bei der Einleitung bzw. Beschleunigung des Baustoffwechsels, d. h. der Plasmasynthese, von Bedeutung. An eine Identität in dem Wirkungsmechanismus für alle vier Eigenschaften ist zu denken.

III. Worin besteht die wachstumshemmende Wirkung des CO_2-Entzugs?

Wir konnten in unserer Literaturübersicht zeigen, daß viele Mikroorganismen CO_2 zur Vermehrung brauchen. Dies gilt auch für völlig andere Arten von sich vermehrenden Zellen, z. B. den Fibroblasten, die nach R. Meier (1932) zu ihrer Vermehrung ebenfalls CO_2 benötigen. In einer CO_2-freien Atmosphäre soll es unmöglich sein, Fibroblastenkulturen zu züchten. Schimmelpilze (Penicillium roquef.) zeigen nach Golding (1940) bei kleinen CO_2-Konzentrationen in Luft eine

Erhöhung des Wachstums, während ein großer CO_2-Gehalt hemmend wirkt. Kausale Anhaltspunkte gibt es hier ebensowenig wie bei dem CO_2-Bedarf der Bakterien.

Die *quantitative Beziehung* zwischen Vermehrung und CO_2-Konzentration zeigt für die früher angeführten Bakterienarten von GLADSTONE, FILDES und RICHARDSON (1935), daß der notwendige Minimalgehalt für CO_2 noch unterhalb der CO_2-Konzentration der atmosphärischen Luft liegt (0,03%), während sich für das Beispiel von Bact. lactis aerogenes (DAGLEY und HINSHELWOOD 1938) ergibt, daß das Wachstum schnell bis zu einem Grenzwert zunimmt, der bei einem CO_2-Gehalt von 0,15% in der Gasphase liegt. Der fördernde Effekt von CO_2 besteht also noch in einem Bereich oberhalb der zum Wachstumsbeginn notwendigen Minimalkonzentrationen. Nach R. DAVIES (1940) lag so das Wachstumsoptimum für menschliche Tuberkelbazillen (Stamm 37) bei 2,5% CO_2, das sich im Gleichgewicht mit 0,0125 Mol $NaHCO_3$ bei $p_H = 7{,}4$ befand. Durch CO_2 wird auch bei B. botulinus Wachstum und Toxinbildung so gefördert, daß die Untersucherin (F. M. BELOUSSKAJA, 1940) die Konservierung von Produkten, die als häufige Ursache von Botulismus bekannt sind, in einer CO_2-Atmosphäre als unzweckmäßig ablehnt.

Die Frage nach der Größe der wachstumseinleitenden CO_2-Konzentration in der Kulturflüssigkeit wird somit für die verschiedenen Arten von Mikroorganismen verschieden beantwortet werden müssen. Nach Ansicht verschiedener Untersucher ist die „lag phase" erst dann beendet, wenn von der sich vermehrenden Einsaat der wachstumsnotwendige CO_2-Gehalt erreicht worden ist. *Somit ist die bakterielle Wachstumshemmung bzw. -verzögerung durch CO_2-Mangel aufzufassen als eine künstlich in die Länge gezogene „lag phase".*

Man kann sich nun mehrere Möglichkeiten über die wachstumsverhütende Wirkungsweise beim CO_2-Entzug vorstellen:

1. Kommt es bei Wegnahme der CO_2 zu wesentlichen p_H-Änderungen, die eine Vermehrung unmöglich machen?

Diese Frage muß nach den Untersuchungen von GLADSTONE, FILDES und RICHARDSON (1935), die bereits in der Literaturübersicht angeführt wurden, als genügend verneint gelten.

2. Wird die CO_2 im Energiestoffwechsel oder im Baustoffwechsel stofflich mitverwertet?

Es gibt in der Tat Bakterien, bei denen die angebotene CO_2 in Produkte des *Energiestoffwechsels* eingebaut wird.

So wird z. B. die aus $CaCO_3$ gebildete Kohlensäure von Propionsäurebakterien bei Gegenwart von Glyzerin verwertet (WOOD und WERKAMM 1936, 1938, 1941). Der C der verwendeten CO_2 erschien wieder in den Gärprodukten (Bernstein-, Propion-, Essigsäure und Propylalkohol). Die Zunahme des organischen C entsprach der Abnahme an anorganischem C (CO_2).

Die Untersucher nahmen an, daß die Bernsteinsäurebildung durch Synthese aus einer 3-C-Verbindung und CO_2 erfolgt. Nach ELSDEN (1938) sollen auch Kolibakterien bei der Spaltung von Brenztraubensäure CO_2 bei der Bildung von Bernsteinsäure miteinbeziehen. In ähnlicher Richtung verliefen Untersuchungen von CARSON, FOSTER, RUBEN und KAMEN (1940), die bei Propion-

säurebakterien den Radiokohlenstoff von zugeführtem markierten CO_2 in der gebildeten Propionsäure nachweisen konnten, womit die *Fähigkeit lebender Zellen zur CO_2-Verwertung* gezeigt wurde.

Die Möglichkeit, die CO_2 bei dem *Aufbau* bzw. der *Erhaltung des Zellmaterials* zu verwenden, geht aus den Versuchen von Ruben und Kamen (1941) hervor. Danach formten Propionsäurebakterien 80% dargebotene CO_2 zu Propion- und Bernsteinsäure um. Die restlichen 20% CO_2 wurden *dem Zellmaterial einverleibt.*

Eine andere Auffassung, unter anderem von Hirsch (1941) angeführt, geht dahin, daß bei der *Plasmasynthsee* karbamidartige Verbindungen oder ähnliche Anlagerungen der CO_2 als Vor- bzw. Zwischenstufen von Bedeutung sind.

3. Spielt die CO_2 eine Rolle als Bestandteil in einem Enzymsystem ?

Die hierüber vorliegenden Untersuchungen sind noch sehr spärlich. Die *Rolle der CO_2 in einem Donator-Akzeptorsystem* ist denkbar. Nach Krebs (1937) und Hes (1938) ist neben anderen Stoffen die CO_2 als H-Überträger bei der Atmung von Kolibazillen für das Zustandekommen der Oxydations-Reduktionskatalyse von wesentlicher Bedeutung. So konnten bei restloser Entfernung von CO_2 durch KOH Kolibazillen oder Bact. prodig. Methylenblau nicht mehr reduzieren.

Wir sehen aus der Verschiedenheit der Wirkungstheorien, wie vielseitig die Angriffsmöglichkeiten im Bakterien-Vermehrungsstoffwechsel sein können. Bei den großen Unterschieden, die bezüglich des Stoffwechselmechanismus zwischen und innerhalb der Organismenarten bestehen, dürfte es zunächst nicht leicht sein, Gemeinsamkeiten in der Wirkungsweise der CO_2 aufzustellen, zumal die Untersuchungen darüber noch ganz in den Anfängen stecken.

IV. Die Beziehung der Wachstumshemmung durch CO_2-Entzug zum antibakteriellen Sulfonamideffekt.

Es ist nicht so, als ob die gebrachten Wirkungen des CO_2-Entzuges auf die Keimvermehrung nur von Bedeutung wären für die Methodik bakterieller Züchtungsversuche oder die analytische Klärung der Stoffwechselleistungen der Mikroorganismen. Die Tatsache des wachstumshemmenden CO_2-Mangels spielt eine wichtige Rolle für die Beurteilung des antibakteriellen Einflusses der Chemotherapeutika bei „in vitro"-Versuchen und deren chemotherapeutischer Wirkung „in vivo".

Bei CO_2-Entzug sind Testbakterien „in vitro" von vornherein als „minderwertig" zu betrachten. Die Vermehrungsvorgänge sind, ohne daß z. B. eine Sulfonamidwirkung stattgefunden hat, von Anfang an durch den CO_2-Entzug entweder unterbunden oder zum mindesten verzögert worden. In umgekehrter Richtung, wie wir dies für die Kennzeichnung des „Inhibitor"-Effektes der Pepton- und Fleischsubstanzen

kennenlernten, kann hier von einer „*Verstärker*"-*Wirkung des* CO_2-*Mangels auf den bakteriostatischen Einfluß der Sulfonamide* gesprochen werden Es muß also bei allen chemotherapeutischen „*in vitro*"-Versuchen darauf geachtet werden, daß die CO_2 in solchen Konzentrationen innerhalb der Prüfungskulturen anwesend ist, daß keine Wachstumsverzögerung, geschweige denn -hemmung eintritt. Schon in Versuchsanordnungen, die gar nicht als besonders CO_2-entziehend beachtet wurden, spielt dieser Gesichtspunkt eine Rolle. Hämolytische Streptokokken, die besonders empfindlich gegen CO_2-Mangel sind, stellen z. B. bei Rotationsversuchen in normalem menschlichem Blut (FULLER, COLEBROOK und MAXTED, 1939) ihre Vermehrung ein, wenn die Kulturröhrchen nicht verschlossen werden.

So spielt sicherlich oft der CO_2-Mangel eine Rolle, wenn bei Züchtungsversuchen zum Zwecke einer antibakteriellen Stoffprüfung Kulturen „nicht" oder nur „verzögert" angehen. Es ist zu empfehlen, daß bei solchen in vitro-Testen jede allzu lange Vergrößerung der „lag phase" von nicht behandelten Kontrollkulturen dahin kritisch betrachtet wird, daß sie durch einen nicht beachteten CO_2-Mangel verursacht sein könnte.

Betrachten wir die Beziehung von CO_2-Gehalt und Bakterienvermehrung für die Verhältnisse „*in vivo*", dann ergibt sich ein sehr viel verwickelteres Bild. Nach FULLER, COLEBROOK und MAXTED (1939) steht zunächst eindeutig fest, daß der CO_2-Gehalt des zirkulierenden Blutes stets größer ist als in dem Blut, das sie für ihre Streptokokkenversuche in geschlossenen Röhrchen benutzten, und somit auch mehr als ausreichend ist, um den Streptokokken, — die vielleicht von einer septischen Thrombophlebitis oder einer ulzerösen Endokarditis stammen —, die Möglichkeit zu geben, sowohl zu überleben als auch sich zu vermehren. Wenn trotz dieser günstigen CO_2-Konzentration die Erreger meist erst in den letzten Lebensstunden sich frei im Blute vermehren, dann muß angenommen werden, daß die Streptokokken beim langsamen Durchfließen durch die Kapillaren von den Leukozyten und den Zellen des retikulo-endothelialen Systems andauernd beseitigt und abgetötet werden. Wir sehen also, wie der phagozytäre Säuberungsmechanismus ganz andere Bedingungen schafft als im Glasversuch und wie die Blutverhältnisse dem letzteren erst angenähert werden, wenn diese Abwehrvorgänge in der Agonie zum Erliegen kommen. Immerhin kann die Möglichkeit überlegt werden, ob bei Stauungszuständen — hierzu gehört auch die kurative Stauungshyperämie — nicht durch den erhöhten CO_2-Gehalt des stockenden, tiefvenösen Blutes die Erreger günstigere Vermehrungsbedingungen vorfinden als in normalem, fließendem Blute. Neben vielen anderen Faktoren, die sich aus einer solchen lokalen Kreislaufänderung ergeben,

insbesondere auch den erschwerten Antransport des Chemotherapeutikums, muß damit gerechnet werden, daß der erhöhte CO_2-Gehalt des infizierten Gewebes nicht nur das bakterielle Wachstum begünstigt, sondern damit auch *die antibakterielle Sulfonamidwirkung selbst hemmt.*

Zusammenfassung.

Bei der manometrischen Messung des O_2-Verbrauches von Kolibakterien mittels der BARCROFT-WARBURG-Methode und unter gleichzeitiger Wachstumskontrolle konnten nachfolgende Ergebnisse erzielt werden:

1. Die WARBURG-Methode stellte in unserer Versuchsanordnung ein *CO_2-entziehendes* System dar, das unter gewissen Bedingungen imstande ist, während der Versuchszeit die Atmungssteigerung und das Wachstum von Kolibakterien in synthetischen Nährmedien zu unterbinden bzw. zu verzögern.

2. Der *CO_2-Mangeleffekt* wurde nachgewiesen für die synthetischen Medien: Mol/10 Asparagin (bzw. -säure) + 1% Glukose in Mol/15 Phosphatpuffer ($p_H = 7{,}2$), sowie für das sog. „KNIGHT-Medium". Gehemmte Kulturen waren nicht tot, sondern wuchsen nach Versuchsende nach. Schon angewachsene Kulturen konnten durch CO_2-Entzug in der Vermehrung nicht mehr aufgehalten werden. Unter Hinweis auf ähnliche Befunde in der Literatur an Streptokokken und anderen Bakterien kann diese bakterielle Wachstumshemmung bzw. -verzögerung durch CO_2-Mangel als eine künstlich in die Länge gezogene „Anlaufszeit" (lag phase) aufgefaßt werden. In bequemer Weise ist es also möglich, Kolibakterien in stickstoffhaltigen, synthetischen Medien durch CO_2-Entzug zur Wachstumsruhe zu bringen, während man sonst nur durch Stickstoffentzug „ruhende Bakterien" im Sinne QUASTELs erzeugen konnte.

3. *Das Eintreten des wirksamen CO_2-Mangels* ist abhängig vom Verhältnis der CO_2-Bildung zum CO_2-Entzug. Bei Gleichbleiben der physikalischen Bedingungen ließ sich somit eine *Grenzeinsaat* (1000—2000 $\times 10^7$), weiterhin ein *Kulturgrenzvolumen* feststellen, oberhalb deren die Wachstumshemmung nicht mehr auftrat. Notwendig war die Verbindung von CO_2-Absorption durch KOH und die Schüttelbewegung. Die Bewegung allein wirkte eher wachstumsbeschleunigend. Bei Absorption in ruhenden Atmungsgefäßen wurde kein wirksamer CO_2-Entzug und somit keine Wachstumshemmung erreicht.

4. In *pepton-* und *bouillon*haltigen Nährlösungen konnte der CO_2-Mangeleffekt *verhindert* werden. Der „wachstumseinleitende Peptoneffekt" ließ sich in Asparaginsäure-Glukose-Phosphatpuffer bis zu einer Verdünnung von 1 : 25600 nachweisen. Die „Wachstumshemmung

durch O_2-Mangel" eignete sich somit gut zum Nachweis der „wachstumseinleitenden Wirkung" von Pepton und Bouillon. Dieser Effekt tritt ergänzend hinzu zu den bekannten Wirkungen der Peptone, und zwar zu derjenigen auf „ruhende Bakterien" im Sinne QUASTELS, zur „Akzelerator"-Wirkung auf wachsende Bakterienkulturen und zur „Inhibitor"-Wirkung gegenüber Sulfonamiden.

5. Aus diesen Ergebnissen können neben theoretischen Folgerungen, die oben erörtert wurden, auch praktische für das Arbeiten mit Versuchskulturen gezogen werden. So muß in allen „in vitro"-Kulturen, in denen ein normales Wachstum sichergestellt oder eine Verstärkerwirkung des CO_2-Mangels auf den bakteriostatischen Substanzeffekt vermieden werden soll, für eine hinreichende CO_2-Konzentration gesorgt werden. Aus diesem Grunde soll, bei Beachtung aller in Frage kommenden physikalischen Faktoren, deshalb auch ein Minimum der Grenzeinsaat nicht unterschritten werden. Die Aufhebung des CO_2-Mangeleffektes durch kleinste Mengen Pepton bzw. Bouillonsubstanzen, weiterhin durch wachstumseinleitende und -beschleunigende Faktoren toter Bakterienleiber bei großen Einsaaten zeigt von einer anderen Richtung her, daß jede Überführung auch geringer Mengen von Peptonen und -haltigen Medien in die Versuchskultur vermieden werden muß und daß eine maximale Grenzeinsaat nicht überschritten werden darf. Nur dadurch kann eine Abschwächung der bakteriostatischen Wirkung eines Stoffes oder gar ein Antagonismus gegenüber demselben ausgeschaltet werden. Hinsichtlich des Gesamtorganismus muß in venös gestauten Infektionsgebieten an eine mögliche Vermehrungsbeschleunigung der Erreger infolge des vorhandenen CO_2-reichtums und eine dadurch bedingte Hemmung des Sulfonamideffektes gedacht werden.

Literatur.

BELOUSSKAYA, F. M.: Probl. nutrit. **9**, 61 (1940). Ref. Chem. Zbl. **1940 II**, 1450. — BRAUN u. CAHN-BRONNER: Biochem. Z. **131**, 226 (1922). — BRAUN u. GOLDSCHMIDT: Zbl. Bakter. usw. I Orig. **109**, 353 (1928). — CARSON, FOSTER, RUBEN and KAMEN: Science (N. Y.) **92**, 433 (1940). — CHAPIN, C. W.: J. infect. Dis. (Am.) **23**, 342 (1918). — COHEN, M. B.: J. amer. med. Assoc. **70**, 1999 (1918). COHEN, M. B. and J. S. FLEMING: J. infect. Dis. (Am.) **23**, 237 (1918). — COHEN, M. B. and L. MARKLE: J. amer. med. Assoc. **67**, 1302 (1916). — DAGLEY, S. and C. M. HINSHELWOOD: J. chem. Soc. (Brit.) **1938**, **1936—1942**. — DAVIES, R.: Brit. J. exper. Path. **21**, 243 (1940). — DICKENS, FR.: In BAMANN-MYRBÄCK: Methoden der Fermentforschung. Bd. 1, S. 985. 1941. — ELSDEN, S. R.: Biochem. J. (Brit.) **32**, 187 (1938). — FILDES, P. and G. M. RICHARDSON: Brit. J. exper. Path. **18**, 292 (1937). — FLEMING, A.: J. Path. a. Bacter. **50**, 69 (1940). — FULLER, A. T., C. COLEBROOK and W. R. MAXTED: J. Path. a. Bacter. **48**, 1 (1939). — GLADSTONE, G. P., P. FILDES and G. M. RICHARDSON: Brit. J. exper. Path. **16**, 335 (1935). — GOLDING, N. S.: D. Dairy Sci. **23**, 891 (1940). — HES, J. W.: Nature (Brit.) **141**, 647 (1938). — HIRSCH, J.: Bull.

Fac. Med. Istambul **4**, 2200 (1941). — Rev. Fac. Sc. Univ. Istambul **1**, 3, 44 (1936). — Microbiol. Proc., II. internat. Kongr. **1936**, 60. — Enzymologia (Nd.) **4**, 94 (1937). — C. r. Soc. Turque Sc. Phys. et Nat. **10** (1941/42). — Knight, B.: Brit. J. exper. Path. **16**, 315 (1935). — Biochem. J. (Brit.) **31**, 731 (1937). — Kohmann, E. F.: J. Bacter. (Am.) **4**, 571 (1919). — Krebs, H. A.: Biochem. J. (Brit.) **31**, 2095 (1937). — Lockwood, J. S.: J. Immunol. (Am.) **35**, 155 (1938). — Meier, R.: Arch. exper. Zellforsch. **12** (1932). — Nitti, F., D. Bovet et F. Depierre: C. r. Soc. Biol. **124**, 16 (1937). — Nowak, J.: Ann. Inst. Pasteur, Pav. **22**, 541 (1908). — Quastel, J. H.: Ruhende Bakterien. In Oppenheimer-Pinkussen: Die Methodik der Fermente. Leipzig 1929. — Erg. Enzymforsch. **1**, 209 (1932). — Rockwell, G. E.: J. infect. Dis. (Am.) **28**, 352 (1921); **32**, 98 (1923); **35**, 581 (1924). — Rockwell, G. E. and J. H. Highberger: J. infect. Dis. (Am.) **38**, 92 (1926); **40**, 438 (1927). — Rockwell, G. E. and C. F. McKhann: J. infect. Dis. (Am.) **28**, 249 (1921). — Ruben, S. and M. D. Kamen: J. appl. Physics. **12**, 321 (1941). — Ruedinger, E. H.: J. infect. Dis. (Am.) **24**, 376 (1919). — Shiskin, C.: Tubercle **20**, 227 (1939). — Soehring, Kl.: Z. exper. Med. **111**, 585 (1942). — Stamp, T. C.: Lancet **1939 II**, 10. — Swartz, E. O. and D. M. Davis: J. amer. med. Assoc. **75**, 1124 (1920). Valley, G.: Quart. Rev. Biol. (Am.) **3**, 209 (1928). — Valley, G. and L. F. Rettger: J. Bacter. (Am.) **14**, 101 (1927). — Walker, H. H.: Science (N. Y.) **76**, 602 (1932). — Warburg, O. u. R. Wiese: Pflügers Arch. **144**, 165 (1912). — Wherry, W. B. and O. M. Ervin: J. infect. Dis. (Am.) **22**, 195 (1918). — Wherry, W. O. and W. W. Oliver: J. infect. Dis. (Am.) **19**, 288 (1916). — Winslow, C. E. A., H. H. Walker and M. Sutermeister: J. Bacter. (Am.) **24**, 185 (1932). Wohlfeil: Zbl. Bakter. usw. Orig. I **127**, 492 (1933). — Wood, H. C. and C. H. Werkman: Biochem. J. (Brit.) **30**, 48—53 (1936); **32**, 1262 (1938). — J. biol. Chem. (Am.) **139**, 365 (1941).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Gießen
(Direktor: Professor Dr. F. Hildebrandt).

Über Kumulation der Digitalisglykoside am Meerschweinchenherzen*.

Von

F. Hildebrandt.

(Eingegangen am 21. Mai 1947.)

Einleitung.

Das Problem der Kumulation der Digitalisglykoside hat durch die bekannten Versuche von Fromherz und Bauer[1, 2] eine sehr wesentliche Komplikation erfahren. Die am Krankenbett auftretenden Erscheinungen der Überdosierung bei länger dauernder Zufuhr von Digitalis ließen sich nach der Hypothese von Hatcher in einfacher und bequemer Weise durch das lange Haftenbleiben der Glykoside in der Herzmuskulatur erklären. Im Widerspruch dazu stand nur die Erfahrung am Krankenbett, daß sehr kleine Digitalisdosen auch über lange Zeit gegeben werden können, ohne daß dabei eine „Kumulation" auftritt.

Bei der Prüfung der Kumulation im Tierexperiment an der Katze mit den verschiedensten Glykosiden der Digitalisgruppe 1. und 2. Ordnung hat man als Vordosis früher ausschließlich hohe Dosen, etwa 50—75 % der bei einmaliger Infusion letal wirkenden Gaben angewandt und aus der nach verschiedenen Zeitintervallen festgestellten Auffülldosis auf den im Herzen noch vorhandenen Giftrest geschlossen. Man hat aber dabei unberücksichtigt gelassen, daß durch die erste doch schon schwer toxische Dosis sich im Herzen Schädigungen einstellen könnten, die die Reaktion des Herzens auf die zweite Giftdosis, die „Auffülldosis", grundlegend verändern würden. Ja, es stellte sich sogar heraus, daß, wie Fromherz und Bauer[1, 2, 3] zeigten, bei dem klassischen Kumulationsgift Digitoxin die zeitlose Beobachtung schließlich zu letalen Digitoxindosen führte, die noch unter der Hälfte der ursprünglich von Hatcher angegebenen tödlichen Dosis lag, und zwar trotzdem er den Kunstgriff angewendet hatte, die tödliche Digitoxindosis wegen ihrer langen Latenz dadurch zu ermitteln, daß in die Digitoxininfusion eine Pause eingeschaltet und dann mit dem schnell wirkenden Strophanthin aufgefüllt wurde.

---

* Die Arbeit war Geheimrat W. Straub zum 70. Geburtstag zugedacht, konnte aber aus äußeren Gründen leider nicht rechtzeitig fertiggestellt werden.

Fromherz und Bauer [4] stellten dann in weiteren Versuchen fest, daß bei Anwendung von kleinen Digitalisdosen (0,05 mg/kg Digitoxin) eine „Kumulation" überhaupt nicht mehr eintrat, während die doppelte Dosis im Abstand von 2 Tagen gegeben von den Tieren nur 2—3mal ertragen wurde. Pathologisch-anatomische Untersuchungen von Büchner [5] ergaben mehr oder weniger ausgedehnte Muskelfasernekrosen, die er auf eine Insuffizienz der Coronardurchblutung zurückführte.

Beim weiteren Ausbau der ersten Untersuchungen stellte dann Bauer [6] fest, daß die Höhe der Auffülldosis von der Schwere der durch die Vordosis gesetzten Schädigung des Herzens abhängig war. Während man nach kleinen Digitoxindosen nach 48 Stunden die volle Auffülldosis von Strophanthin brauchte, benötigten die Tiere mit höheren Digitoxindosen meistens nur eine kleine Zusatzdosis, ein Teil aber die volle. Dabei ergab die physikalische Untersuchung des Herzens (Bauer, sowie Bauer und Reindell [6, 7, 8]), daß sich das Schicksal der Tiere nach 2—4 Tagen entschied. Tiere mit Rhythmusstörungen und Zunahme der Herzfrequenz gingen entweder spontan zugrunde oder benötigten geringe Zusatzdosen, während beim Erhaltenbleiben einer normalen Herzaktion die Auffülldosis eine höhere war. Die gleichen Veränderungen fand Bauer [6] auch nach Strophanthin, allerdings waren von diesem Gift entsprechend höhere Dosen hierzu notwendig.

Die Versuche von Fromherz und Bauer wurden von verschiedenen Seiten bestätigt. So von Weese und Dieckhoff [9] und weiter von Lendle [10]. Darüber hinaus stellten erstere bei der Prüfung der Leistungsfähigkeit der Herzen von mit kleinen (0,1) und größeren (0,2 g/kg) Dosen vorbehandelten Tieren am Herz-Lungenpräparat derselben eine günstige Wirkung der kleinen, aber eine ungünstige der größeren Dosen auf die Leistungsfähigkeit fest. Eine günstige Wirkung von kleinen Glykosiddosen auf die Leistungsfähigkeit des Herzens fand weiter Schäfer [11], als er den Effekt prophylaktischer Digitalisierung in Form von täglichen Injektionen von $^1/_{25}$ der letalen Dosis von Digipurat über 4 Tage prüfte.

Die Anschauung der Kumulation als Ausdruck einer chemischen Anreicherung wurde durch Lendle [10] als unhaltbar erwiesen durch den Nachweis, daß sogar die so hoch digitoxinempfindliche Katze imstande ist, 2% der letalen Digitoxindosis je Stunde zu eliminieren, so daß innerhalb von 48 Stunden überhaupt kein Glykosid vorhanden sein kann. Zudem fand er bei täglicher subkutaner Injektion von 6% der letalen Digitoxindosis bei nachheriger Auffüllung mit Strophanthin zum Teil mehr als der gesamten bisher gegebenen Glykosidmenge entsprach. Injizierte er unter 3% der letalen Digitoxindosis, so blieb jegliche Nachwirkung aus. Durch k-Strophanthin fand er erst bei einer Dosierung von $7^1/_2$—10% der letalen Dosis eine sichere Nachwirkung,

bei den Vordosen in Höhe von $4^1/_2$—6% war nur in einigen Fällen eine kumulative Wirkung nachweisbar. Bei den Grenzdosierungen konnten histologisch die von Büchner beschriebenen Nekrosen in der Herzmuskulatur nicht festgestellt werden, und so denkt Lendle an eine Empfindlichkeitssteigerung des Herzens im Sinne einer „allobiotischen" Reaktion nach Heubner. Neuerdings hat aber Lindner [12] festgestellt, daß auch bei vorsichtiger Dosierung von Digitoxin morphologische Veränderungen in der Herzmuskulatur auftreten. So fand er bei subkutaner Verabfolgung von 55% der Hatcher-Dosis, in einzelne Fraktionen aufgeteilt, innerhalb von 11 Tagen oder bei Verabfolgung von täglich 3,3%, 44 Tage lang gegeben, eben erkennbare Verfettung des Myokards, zum Teil aber auch schwere fettige Degenerationen mit Übergang in Nekrose.

Aus dieser kurzen Übersicht dürfte zur Genüge hervorgehen, daß die früheren Untersuchungen über die Kumulation von Digitalis mit der eigentlichen Kumulation, wenn man darunter die chemische Anreicherung der Substanz versteht, nichts zu tun haben, und daß man dabei, wie es auch Fromherz und Bauer [1] und Weese in seiner Digitalismonographie klar aussprechen, eher von einer Kumulation der Wirkung sprechen muß. In erster Linie betrifft dies allerdings das Digitoxin, bei dem die Herzmuskelschädigung schon bei verhältnismäßig niedrigen Dosen stark ausgeprägt ist. Die Digitaloide können wohl eher in ihrer Kumulationsfähigkeit danach bemessen werden, da bei ihnen die Nekrosen der Herzmuskulatur erst bei verhältnismäßig hohen Dosen auftreten.

Digitoxin.

Bekanntlich ist die Katze ganz besonders digitoxinempfindlich. Wie sich das Meerschweinchen der kumulativen Wirkung von Digitalisglykosiden gegenüber verhält, ist bisher noch nicht untersucht. Für Auswertungszwecke ist es schon vor längerer Zeit als geeignetes Objekt von Knaffl-Lenz [13] empfohlen worden und Straub [14, 15, 16] hat diesem Tier besondere Aufmerksamkeit als geeignetem Objekt geschenkt, indem er die Zeit-Mengenbeziehungen in gründlichen Untersuchungen genau festlegte. Desgleichen hat Goldberg [17] eingehende Untersuchungen nach dieser Richtung mit günstigen Ergebnissen für Auswertungszwecke vor kurzem veröffentlicht.

Auch bei diesem Tier hängt nach Straub die letale Dosis von Strophanthin ebenso wie bei der Katze vom Giftangebot ab, ist also eine Funktion der Konzentration und der Infusionsgeschwindigkeit. Straub fand als minimale letale Dosis bei einer Konzentration von 1:50000 den Wert von 0,26 mg/kg nach 57 Min. Infusionszeit. Wir fanden (Tabelle 1a) das Optimum bei einer Konzentration von 1:80000 in Höhe von 0,232 mg/kg bei der Infusionszeit von 35 Min. Um ein

Tabelle 1a. *g-Strophanthin* (auf wasserfreies berechnet).
(Durchschnittswerte aus je 3 Versuchen).

Konzentration der Lösung	Dosis letalis mg je 100 g	ME je g	Infusionszeit	
			Min.	Sek.
1: 10000	0,0375	2666700	6	50
1: 20000	0,0290	3443350	8	37
1: 40000	0,0234	4273500	20	11
1: 80000	0,0232	4310300	34	41
1:160000	0,0302	3311200	79	03

Tabelle 1b. *g-Strophanthin* (auf wasserfreies berechnet.)
Dosis letalis bei einmaliger intravenöser Injektion. Lösung: 1 : 80000.

Tiergewicht in g	Dosis letalis mg je 100 g	Infusionszeit		Tiergewicht in 100 g	Dosis letalis mg je 100 g	Infusionszeit	
		Min.	S. k.			Min.	Sek.
614	0,0165	36	22	494	0,0225	38	45
633	0,0168	39	8	827	0,0245	72	47
521	0,0172	31	38	508	0,0252	44	34
254	0,0176	16	28	269	0,0263	25	7
468	0,0178	29	10	272	0,0266	26	31
285	0,0186	17	51	250	0,0301	27	8
315	0,0213	24	34	321	0,0334	38	57
307	0,0222	24	47	498	0,0343	61	14
				Mittelwert:	0,0232	34	41

Bild über die normale Streuung zu haben, haben wir für die optimale Konzentration von 1 : 80000 eine größere Reihe von 16 Tieren verwandt (Tabelle 1b).

Die Vordosis sowohl von Digitoxin wie Strophanthin gaben wir der Einfachheit halber subkutan, nachdem in Reihenversuchen die mittlere tödliche Dosis mit 0,45 bzw. 0,0275 mg/100 g ermittelt war. Es wurden 3 Versuchsreihen gebildet mit Vordosen in Höhe von 15%, 30% und 50% der subkutan letalen Dosen. Nach verschiedenen Zeiten, zwischen 1 Tag bis zu 28 Tagen wurde die Auffülldosis mit g-Strophanthin gegeben. Ein Teil der Tiere erlebte die Auffülldosis nicht, sondern ging spontan früher unter den typischen Erscheinungen der Digitalisvergiftung zugrunde. Bei Digitoxin war leider versäumt worden, die Anzahl der so gestorbenen Tiere festzustellen, doch war es immerhin ein recht erheblicher Prozentsatz, besonders bei der hohen 50%igen Vordosis. Aber auch bei anderen niedrigen Dosen ging ein Teil der Tiere spontan zugrunde. Dies macht natürlich für die Bewertung der späteren Strophanthinempfindlichkeit sehr viel aus, da dadurch eine gewisse Auslese der Tiere statthat, denn die digitoxinempfindlichen scheiden durch ihren spontanen Tod aus und die resistenten bleiben übrig und können so eine Resistenzsteigerung als Folge ihrer Vorbehandlung mit Digitoxin vortäuschen. Davon wird später noch die Rede sein.

Nun zu den einzelnen Versuchen, und zwar zunächst einmal zu der Versuchsreihe, in der die 15%ige tödliche Dosis den Tieren verabreicht wurde.

Tabelle 2. *Digitoxin.*

Vordosis: 15% der letalen Digitoxindosis s.c. Auffülldosis mit Strophanthin i.v.

Tier Nr.	Auffülldosis nach Tagen	Tiergewicht in g	Dosis letalis mg je 100 g	% der letalen Strophanthindosis
1	1	236	0,0254	109
2	1	421	0,0166	71
3	1	429	0,0238	103
4	1	501	0,0246	106
5	1	614	0,0254	109
		Mittelwert:	0,0232	100
6	3	482	0,0225	97
7	3	275	0,0150	65
8	3	254	0,0366	158
9	3	226	0,0250	108
10	3	287	0,0371	160
11	3	237	0,0397	171
		Mittelwert:	0,0293	126
12	4	229	0,0403	174
13	4	242	0,0278	120
14	4	441	0,0217	93
15	4	197	0,0260	112
16	4	258	0,0278	120
17	4	483	0,0213	92
18	4	324	0,0230	99
19	4	325	0,0306	132
20	4	260	0,0214	92
		Mittelwert:	0,0266	115
21	7	204	0,0351	151
22	7	308	0,0256	110
23	7	495	0,0134	58
24	7	555	0,0173	75
25	7	325	0,0311	134
		Mittelwert:	0,0245	106
26	14	354	0,0321	138
27	14	347	0,0253	109
28	14	306	0,0182	78
29	14	566	0,0149	64
30	14	279	0,0180	78
		Mittelwert:	0,0216	93

Nach 24 Stunden ist durch die Vordosis der Mittelwert nicht verändert, dagegen ist am 3. Tag eine deutliche Steigerung über den Normalwert festzustellen. Besonders ausgesprochen ist diese Steigerung bei der Hälfte der Tiere, die Werte erreichen, die eindeutig über dem

Maximalwert der normalen Streuung ohne Vordosis liegen (Tier 8, 10 und 11). Zwei Tiere liegen ungefähr auf dem Normalwert (6 und 9), während ein Tier (7) sehr stark unterhalb des Mittelwertes liegt. (Es wäre wohl, wenn es länger am Leben geblieben wäre, Kandidat für den Spontantod gewesen.) Am 4. Tag liegt der Mittelwert mit 118% des Mittelwertes ohne Vordosis bereits etwas niedriger und nach 7 Tagen ist etwa der normale Mittelwert wieder erreicht, wenn auch zwei Tiere (21 und 23) wieder sehr erheblich den normalen Mittelwert über- bzw. unterschreiten. Auch nach 14 Tagen ist der Mittelwert wieder normal.

Tabelle 3. *Digitoxin.*
Vordosis: 33% der letalen Digitoxindosis s.c., Auffülldosis mit Strophanthin i.v.

Tier Nr.	Auffülldosis nach Tagen	Tiergewicht in g	Dosis letalis mg je 100 g	% der letalen Strophanthin-dosis
1	1	216	0,0382	165
2	1	222	0,0379	163
3	1	302	0,0329	142
4	1	377	0,0256	110
5	1	337	0,0236	102
6	1	297	0,0286	123
		Mittelwert:	0,0311	134
7	2	284	0,0272	117
8	2	256	0,0202	87
9	2	328	0,0264	114
10	2	251	0,0346	149
11	2	217	0,0245	105
12	2	196	0,0370	159
		Mittelwert:	0,0283	122
13	3	221	0,0385	166
14	3	226	0,0356	154
15	3	234	0,0337	145
16	3	211	0,0369	159
17	3	227	0,0354	153
18	3	217	0,0338	146
		Mittelwert:	0,0357	154
19	7	170	0,0294	127
20	7	224	0,0335	144
21	7	169	0,0339	146
22	7	221	0,0312	134
23	7	158	0,0408	176
24	7	329	0,0389	167
		Mittelwert:	0,0346	148
25	28	412	0,0178	77
26	28	263	0,0204	88
27	28	291	0,0212	92
		Mittelwert:	0,0198	85

Die kleine Digitoxinvordosis führt demnach eindeutig am 3. und 4. Tag zu einer Resistenzsteigerung gegenüber dem Strophanthin, die aber einige Tage später wieder abgeklungen ist.

Wesentlich stärker sind die Ausschläge nach der etwas höheren Digitoxindosis ($^1/_3$ der letalen Gabe). Am ersten Tag liegen alle Werte über dem Mittelwert ohne Vordosis, besonders hohe Werte weisen

Tabelle 4. *Digitoxin.*

Vordosis: 50% der letalen Digitoxindosis s.c., Auffülldosis mit Strophanthin i.v.

Tier Nr.	Auffülldosis nach Tagen	Tiergewicht in g	Dosis letalis mg je 100 g	% der letalen Strophanthindosis
1	1	298	0,0229	99
2	1	294	0,0314	135
3	1	365	0,0155	67
4	1	521	0,0189	81
5	1	498	0,0140	60
6	1	385	0,0160	69
		Mittelwert:	0,0198	85
7	3	297	0,0114	49
8	3	232	0,0248	107
9	3	206	0,0335	144
10	3	599	0,0199	86
11	3	570	0,0165	71
12	3	549	0,0209	90
		Mittelwert:	0,0212	91
13	4	212	0,0245	106
14	4	489	0,0177	76
15	4	526	0,0204	88
16	4	501	0,0240	103
17	4	371	0,0273	118
18	4	250	0,0348	150
19	4	600	0,0264	114
		Mittelwert:	0,0250	108
20	7	280	0,0298	127
21	7	231	0,0302	130
22	7	295	0,0268	115
23	7	217	0,0371	160
24	7	247	0,0225	97
		Mittelwert:	0,0293	126
25	28	263	0,0238	103
26	28	329	0,0288	124
27	28	495	0,0298	129
28	28	275	0,0290	125
29	28	264	0,0298	129
30	28	325	0,0237	102
31	28	285	0,0250	108
32	28	294	0,0234	101
		Mittelwert:	0,0266	115

Tier 1 und 2 auf. Auch am zweiten Tag ist eine Steigerung mit Ausnahme von einem Tier deutlich erkennbar und besonders hohe Werte werden am 3. Tag erreicht, an dem der normale Mittelwert im Durchschnitt um 54% überschritten wird. Auch nach 7 Tagen liegen die Werte noch sehr erheblich über dem normalen Mittelwert. Nach 4 Wochen ist diese Resistenzsteigerung abgeklungen. Die Werte liegen etwas unterhalb des normalen Mittelwertes, doch ist anzunehmen, daß bei einem Einsatz von mehr Tieren (was leider aus äußeren Gründen nicht möglich war), ein normaler Wert gefunden worden wäre.

Erst die hohe Vordosis von 50% der subkutan letalen Dosis führt zum üblichen Bild der „Kumulation". Die Werte von 1. und 3. Tag liegen besonders bei einigen Tieren (3, 5, 7 und 11) sehr erheblich unter dem Mittelwert ohne Vordosis, nur bei ganz wenig Tieren (Tier 2 und 9) kommen die Werte in den Bereich der oberen normalen Streuung hinein. Am 4. Tag ist der Normalwert wieder etwa erreicht. Dagegen liegen am 7. Tag die Werte wieder deutlich erhöht und auch nach 4 Wochen ist noch eine leichte Steigerung unverkennbar.

g-Strophanthin.

Analoge Versuche wurden mit g-Strophanthin angestellt, das uns ebenso wie das Digitoxin in entgegenkommender Weise von der Fa. Merck, Darmstadt zur Verfügung gestellt war. Klinisch kumuliert das Strophanthin bekanntlich ja kaum und so waren bei diesem eigentlich gar keine Ausschläge zu erwarten. Als mittlere letale subkutane Dosis stellten wir in Reihen von je 6 Tieren 0,0275 mg/100 g Meerschweinchen fest. Von dieser Dosis wurden ebenfalls 2 Reihen in Höhe von 15 und 50% Vordosis angesetzt.

Bei der kleinen Vordosis von 15% starben von 61 insgesamt injizierten Tieren 17 spontan mit einem Kulminationspunkt am 4. Tag (9 Tiere). Eine gewisse Auslese durch den Spontantod ist also zweifellos gegeben und man wird nur solche Werte bei der späteren Auffülldosis als wirklich durch eine Resistenzsteigerung bedingt ansehen dürfen, die erheblich über dem Mittelwert liegen. Dies trifft nur für den 1. Tag zu, an dem alle Tiere einen höheren Wert als den üblichen Mittelwert aufweisen und 2 Tiere (2 und 4) stark über dem Streuungsmaximum des Normalversuches liegen. Die um 12 und 18% über dem Mittelwert ohne Vordosis liegenden Werte am 2. und 3. Tag sind wohl sicher in diesem Sinne zu deuten, wenn es auch auffallend ist, daß die Erhöhung des Mittelwertes am 4. Tag wieder ausgeglichen ist.

Von den mit 50% der subkutanen letalen Dosis eingespritzten 73 Tieren starben 19 spontan, davon die Mehrzahl am 1. und 2. Tag (je 5 Tiere). Die restlichen Todesfälle verteilen sich auf den 3. bis 11. Tag

Tabelle 5. *g-Strophanthin Merck.*
Vordosis: 15% der letalen Strophanthindosis s.c., Auffülldosis mit Strophanthin i.v.

Tier Nr.	Auffülldosis nach Tagen	Tiergewicht in g	Dosis letalis mg je 100 g	% der letalen Strophanthindosis
1	1	282	0,0308	133
2	1	354	0,0382	165
3	1	334	0,0270	116
4	1	337	0,0382	165
5	1	422	0,0334	145
6	1	351	0,0245	106
7	1	315	0,0250	107
		Mittelwert:	0,0310	134
8	2	383	0,0241	104
9	2	373	0,0300	129
10	2	400	0,0307	132
11	2	272	0,0191	82
12	2	307	0,0228	98
13	2	287	0,0284	122
		Mittelwert:	0,0259	112
14	3	442	0,0309	133
15	3	419	0,0150	65
16	3	212	0,0216	93
17	3	365	0,0334	144
18	3	287	0,0318	137
19	3	243	0,0313	135
		Mittelwert:	0,0273	118
20	4	497	0,0167	72
21	4	428	0,0214	92
22	4	395	0,0209	90
23	4	244	0,0319	138
24	4	290	0,0287	124
25	4	294	0,0250	108
		Mittelwert:	0,0241	104

ziemlich gleichmäßig, nur am 7. Tag war ein Maximum mit 4 Tieren vorhanden. Somit hat ein nicht unerheblicher Prozentsatz die Auffülldosis nicht mehr erlebt, so daß auch in dieser Versuchsreihe mit einer gewissen Auslese zu rechnen ist, insofern als die weniger resistenten Tiere bereits kurz nach der Vordosis eingegangen sind.

Die hohe Vordosis von 50% Strophanthin zeigt am 1. Tag einen leichten Abfall des Mittelwertes um 10%. Die Zahlen der ersten 6 Tiere liegen indessen im normalen Streuungsbereich. Nur die beiden Tiere 7 und 8 liegen deutlich unterhalb des Minimums als Zeichen dafür, daß bei einer höheren Strophanthindosis gelegentlich auch irreversible Veränderungen am Herzen auftreten, die allerdings noch nicht am ersten Tag nach der Injektion zum Tode führen.

Tabelle 6. *g-Strophanthin Merck.*
Vordosis: 50% der letalen Strophanthindosis s.c., Auffülldosis mit Strophanthin i.v.

Tier Nr.	Auffülldosis nach Tagen	Tiergewicht in g	Dosis letalis mg je 100 g	% der letalen Strophanthindosis
1	1	414	0,0221	95
2	1	412	0,0227	98
3	1	481	0,0220	95
4	1	345	0,0293	126
5	1	331	0,0208	90
6	1	478	0,0226	97
7	1	581	0,0148	64
8	1	497	0,0126	54
		Mittelwert:	0,0208	90
9	2	492	0,0204	88
10	2	354	0,0255	110
11	2	400	0,0192	83
12	2	324	0,0139	60
13	2	308	0,0288	124
14	2	474	0,0225	97
		Mittelwert:	0,0217	93
15	3	489	0,0205	88
16	3	557	0,0182	78
17	3	401	0,0297	128
18	3	244	0,0338	146
19	3	425	0,0110	47
20	3	335	0,0171	74
		Mittelwert:	0,0217	93
21	4	415	0,0138	60
22	4	595	0,0114	49
23	4	614	0,0193	83
24	4	277	0,0177	76
25	4	356	0,0260	112
26	4	389	0,0177	76
		Mittelwert:	0,0177	76
27	7	383	0,0356	153
28	7	313	0,0244	105
29 *	7	339	0,0158	68
30	7	313	0,0246	106
31	7	374	0,0268	115
32	7	447	0,0260	112
		Mittelwert:	0,0255	110
33	14	592	0,0319	137
34	14	295	0,0200	86
35	14	477	0,0302	130
36	14	503	0,0313	135
37	14	300	0,0328	141
38	14	355	0,0245	106
		Mittelwert:	0,0285	123
39	28	539	0,0173	75
40	28	511	0,0186	80
41	28	611	0,0210	90
42	28	439	0,0278	120
43	28	527	0,0162	70
44	28	320	0,0244	105
		Mittelwert:	0,0209	90

* Abgemagertes Tier.

Am 2. Tag nach der Injektion ist der Normalwert auch praktisch innegehalten. Nur das Tier 12 zeichnet sich durch einen besonders niedrigen Wert aus. Dasselbe gilt für die Tiere vom 3. Tag. Auffallend niedrig liegen die Werte noch einmal am 4. Tag, besonders die Tiere 21 und 22.

Am 7. Tag nach der Vordosis ist ein gewisser Anstieg des Mittelwertes vorhanden, die Zahlen liegen gegen den oberen Rand des Streuungsbereiches mit Ausnahme von Tier 29, das aber sehr heruntergekommen war und wohl deswegen ausgeschieden werden könnte. Der Wert von Tier 27 dürfte sogar außerhalb des normalen Streuungsbereiches liegen.

Auffallend hoch liegt der Mittelwert nach 14 Tagen. Es sieht doch so aus, als ob hier nicht die Streuung schuld wäre, sondern daß hier eine Resistenzsteigerung zu verzeichnen ist, die allerdings lange nicht die Steigerung wie bei den Digitoxinvordosen erreicht.

Nach 4 Wochen gruppieren sich die Zahlen wieder annähernd um den normalen Mittelwert. Die Wirkung der Vordosis ist also abgeklungen.

Die kleine und die große Strophanthinvordosis beeinflussen somit die Strophanthinempfindlichkeit in den der Vordosis folgenden Tagen verschieden: Bei der kleinen Vordosis kommt es zu einer vorübergehenden Resistenzsteigerung, während die große Vordosis die Giftempfindlichkeit erhöht.

Besprechung der Ergebnisse.

Überblickt man noch einmal kritisch die Ergebnisse, so ist zunächst einmal festzustellen, daß eine Vordosis von 15 und 33% der subcutan letalen Dosis von Digitoxin zu einer verminderten Empfindlichkeit der Tiere gegenüber einer späteren Strophanthindosis führt, die eine gewisse Anzahl von Tagen enhält. Die Vordosis von 50% der letalen Digitoxindosis ruft dagegen eine Empfindlichkeitssteigerung in den ersten Tagen hervor. Es erhebt sich nun die Frage, ob die hier gefundene Resistenzsteigerung tatsächlich vorhanden ist oder ob sie irgendwie vorgetäuscht wird. Ein reiner Zufall kommt nicht in Frage, dazu liegen die gefundenen Werte zu gleichmäßig und die Zahl der Versuche ist eine zu hohe. Dagegen muß eine Auslese der Tiere ernsthaft in Erwägung gezogen werden. Die Reaktion dem Digitoxin gegenüber ist zweifellos sehr verschieden. Manche Tiere sind sehr empfindlich, sie sterben schon an einer verhältnismäßig kleinen Vordosis und erleben ihre Auffülldosis nicht mehr. Es sind offenbar solche, bei denen wie bei der Katze im Anschluß an die Vordosis irreversible Schädigungen der Herzmuskulatur eintreten. Durch den Ausfall dieser empfindlichen Tiere und das Übrigbleiben der mehr oder weniger stark unterempfindlichen Tiere wird natürlich der Mittelwert stark nach oben verschoben, doch

ist dabei nicht anzunehmen, daß die Verschiebung in einem so hohen Grade erfolgen könnte, daß Werte über dem normalen Streuungsbereich einwandfrei gefunden werden. Es bleibt also nur die Erklärung übrig, daß nach Vorbehandlung mit einer kleinen bis mittleren Digitoxindosis die Herzen in einem bestimmten Zeitraum eine erhöhte Resistenz dem Strophanthin gegenüber gewinnen. Ob dieser Resistenzsteigerung irgendwelche Prozesse in der Herzmuskulatur zugrunde liegen oder ob es sich um eine allgemeine Umstellung vielleicht auf innersekretorischem Gebiet handelt, darüber kann nichts ausgesagt werden. Das eine steht fest, daß auch diese Versuchsergebnisse einwandfrei die frühere Anschauung von Hatcher über die Kumulation des Digitoxins widerlegen. Nur die hohe Vordosis von Digitoxin zu einer Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber Strophanthin und täuscht auf diese Weise den Verbleib von Giftresten in der Herzmuskulatur vor. Bei den kleineren Vordosen kommt es auf die Empfindlichkeit der Tiere an. Je nach dem ob sich unter dem Einfluß der Vordosis im Herzen die bekannten von Fromherz und Bauer erstmals festgestellten Nekrosen in der Herzmuskulatur entwickeln oder ausbleiben, ist die Empfindlichkeit der Tiere gegenüber der späteren Strophanthinauffülldosis gesteigert oder, wie wir festgestellt haben, in das Gegenteil verwandelt.

Bei Strophanthin sind die Ausschläge im ganzen geringer. Nach der kleinen Vordosis von 15% der subcutan letalen Dosis ist bei den Tieren, die nicht durch besondere Empfindlichkeit ausgeschieden sind, einige Tage lang auch eine leichte Resistenzsteigerung festzustellen, während nach der hohen Vordosis in den ersten Tagen eine leichte Empfindlichkeitssteigerung eintritt mit dem Höhepunkt am 4. Tag. Daß aber eine gewisse Nachwirkung des Strophanthins doch vorhanden ist, dafür spricht, daß nach 17 Tagen eine leichte Resistenzsteigerung dem Strophanthin gegenüber zu verzeichnen ist.

Literatur.

[1] Fromherz u. Bauer: Klin. Wschr. **1933**, 973. — [2] Fromherz u. Bauer: Arch. exper. Path. (D.) **172**, 693 (1933). — [3] Fromherz u. Welsch: Arch. exper. Path. (D.) **161**, 266 (1931). — [4] Bauer: Arch. exper. Path. (D.) **172**, 699 (1933). — [5] Büchner: Arch. exper. Path. (D.) **176**, 59 (1934). — [6] Bauer: Arch. exper. Path. (D.) **176**, 65, 74 (1934). — [7] Bauer u. Reindell: Arch. exper. Path. (D.) **190**, 461 (1938). — [8] Bauer u. Reindell: Arch. exper. Path. (D.) **191**, 311 (1939). — [9] Weese u. Dieckhoff: Arch. exper. Path. (D.) **176**, 274 (1934). — [10] Lendle: Arch. exper. Path. (D.) **180**, 518 (1936). — [11] Schäfer: Arch. exper. Path. (D.) **174**, 286 (1934). — [12] Lindner: Arch. exper. Path. (D.) **192**, 155 (1939). — [13] Knaffl-Lenz: Arch. exper. Path. (D.) **135**, 259 (1928). — [14] Straub, Kanda u. Zinnitz: Arch. exper. Path. (D.) **194**, 1 (1940). — [15] Straub: Arch. exper. Path. (D.) **198**, 189 (1941). — [16] Straub, Triendl u. Bode: Arch. exper. Path. (D.) **199**, 427 (1942). — [17] Goldberg: Acta physiol. scand. **4**, 178 (1942).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf und der Medizinischen Klinik Freiburg (Direktor: Prof. Dr. L. Heilmeyer).

Substanz P im Blut.

Ein Beitrag zum Spätgiftproblem.

Von

Dr. Ludwig Weissbecker.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 21. März 1947.)

Die Untersuchungen der verschiedenen Autoren über die pharmakologische Wirkung von Organ-, Gewebs- und Blutextrakten haben zu Ergebnissen geführt, die im ganzen gesehen noch nicht die gewünschte Klarheit bringen. Besonders die Frage der Wirkstoffe im Blut läßt noch viele Probleme offen. Daß dem Blut überhaupt pharmakologisch nachweisbare Wirkungen zukommen, ist schon seit langem bekannt.

Im Vordergrund stand dabei zunächst die Gefäßwirkung von Serum bzw. Blut, die zuerst von Läwen [1], dann von Trendelenburg [2] als Adrenalinwirkung angesprochen wurde. O'Connor [3] führte den Nachweis, daß es sich nicht um Adrenalin, sondern um einen histaminähnlichen Stoff handelt. Eine Reihe anderer Autoren beschäftigte sich mit diesem Problem (Trendelenburg [4], Stewart und Zucker [5], Haake [6], Borgert und Keitel [7], Heymann [8], Simon [9] u. a.). In die zum Teil widersprechenden Befunde brachte Freund [10] eine gewisse Klarheit, indem er Frühgift von Spätgift schied und den Vorgang der Vasokonstriktion mit den Thrombozyten und der Gerinnung in Verbindung bringen konnte. Das Prinzip der Trennung von Frühgift und Spätgift war auch bei den Untersuchungen über die Darmwirkung des Blutes fruchtbar. Cannon und La Paz [11] analysierten erstmals diese Wirkung genauer und unterschieden primäre Lähmung des Darmes von sekundärer Erregung. Gleichen Effekt beschrieben O'Connor [12], Stewart [13] u. a. Freund [14] erhielt beide Wirkungen mit Suspensionen von Blutplättchen. Der hemmende Stoff, der zeitlich dem Frühgift entsprach, konnte von Zipf [15] als Adenylsäure identifiziert werden. Dittlers [16] Versuche, besonders über die Dialysierbarkeit der darmtonussenkenden Komponente (er stellte fest, daß diese Komponente nicht dialysiert) standen im Widerspruch zu Zipf [17] und Haakes [18] Ergebnissen. Etwas mehr Klarheit in diese Frage wird durch die Tatsache gebracht, daß Adenylsäure durch autolytische Vorgänge rasch zerstört wird. Bei der Dialyse besonders gegen hypo- bzw. hypertonische Außenflüssigkeit treten Verschiebungen im Bluteiweißstatus auf, die autolytische Vorgänge beschleunigen. So wäre zu erklären, daß in Dittlers Versuchen kein Hemmungsfaktor im Dialysat auftrat, trotzdem Adenylsäure an sich gut dialysierbar ist. Damit dürfte die Frühgiftwirkung des Blutes geklärt sein. Die Spätgiftwirkung dagegen im Hinblick auf die Effekte am Darm sind zur Zeit noch unklar. Guttentag [19] und Jürgenson [20], Zipf und Hülsmeyer [21]

kamen zu dem Schluß, daß Histamin nicht die Ursache der darmkontrahierenden Wirkung sein kann, obwohl weitgehende Ähnlichkeit des Effektes zumindest am Meerschweinchendarm vorlag. Daß Histamin überhaupt in meßbaren Mengen im Blut enthalten ist, wiesen Barsoum und Gaddum [22] nach. Auch sie fanden, daß zumindest ein Teil der darmkontrahierenden Stoffe mit Histamin nicht identisch sei. Daß Cholin bzw. Azetylcholin im Blute in meßbaren Mengen vorkommt, ist von verschiedenen Autoren, besonders von Kapfhammer [23], Chang und Gaddum [24], Gollwitz-Meier [25] u. a., wahrscheinlich gemacht worden trotz zunächst bestehender Widersprüche. Diese Wirkstoffe können zur Erklärung der darmkontrahierenden Wirkung des Blutes ebenfalls nicht herangezogen werden, da diese atropinfest ist. Kahlson [26] glaubt, dem Kreatinin des Blutes eine erregende Wirkung am Mäusedarm zuschreiben zu können. Eulers [27] Nachprüfung dieser Frage am Kaninchendarm führte nicht zu einer Bestätigung des Kahlsonschen Befundes.

Zipf und Hülsmeyer [28], die sich eingehender mit der Spätgiftwirkung des Blutes beschäftigten, bezogen in ihre Untersuchungen auch die von v. Euler und Gaddum [29, 30] aus der Dünndarmmuskularis des Pferdes und aus der grauen Substanz des Gehirns gewonnene Substanz P ein. Der Gedanke lag nahe, da diese Substanz in ihren Wirkungen auf den Darm und den Uterus spätgiftähnliche Effekte hervorruft. Substanz P kontrahiert den isolierten Darm und Uterus und senkt den Blutdruck. Dabei kontrahieren die P-haltigen Präparate Eulers und Gaddums im Durchströmungsversuch die Gefäße. Am Ganztier, aus der Zeitdifferenz zwischen intravenöser und intraarterieller Applikation geschlossen, scheint eine Gefäßerweiterung hervorgerufen zu werden. Die Frage harrt noch der Klärung, ob es sich bei dem gefäßverengenden Faktor um eine P-Wirkung oder um einen davon unabhängigen Effekt handelt. Bei Beachtung der in der Literatur für den vasokontriktorischen Effekt niedergelegten biochemischen Daten, besonders über die Dialysierbarkeit, scheint es sich hierbei nicht um Substanz P zu handeln. Zipf und Hülsmeyer [31] konnten bei der Aufarbeitung des Blutes nach der Euler-Gaddumschen Methode Substanz P nicht finden. Die Autoren haben sich dabei anscheinend nicht genau an die entsprechende Vorschrift gehalten. Sie geben an, das eingedampfte Filtrat, ohne es vorher alkalisch zu machen, extrahiert zu haben. Nach Euler und Gaddum läßt sich Substanz P aber nur in alkalischem, nicht in neutralem oder saurem Milieu mit absolutem Alkohol extrahieren, worauf Euler und Gaddum ausdrücklich hinweisen. Des weiteren steht zur Debatte, ob sich mit der angegebenen Methode überhaupt Substanz P aus dem Blut extrahieren läßt.

Mit dem Folgenden ist versucht worden, qualitativ Substanz P im Blut nachzuweisen und sie als Bestandteil der Spätgiftwirkung zu charakterisieren. Weiterhin sollten durch verschiedene Extraktionsverfahren möglichst reine P-Präparate gewonnen werden, um gegebenenfalls quantitative Untersuchungen durchführen zu können.

Methodik.

Als pharmakologische Untersuchungsobjekte dienten:

1. Der überlebende Mäuse- bzw. Meerschweinchendarm nach Magnus.
2. Die durchströmten Hinterextremitäten von Fröschen nach Läwen-Trendelenburg, von Ratten nach Kohnheim und Katel.
3. Die isolierte Froschlunge nach Corsten.
4. Das isolierte Froschherz nach Straub.
5. Der Blutdruck am atropinisierten Meerschweinchen.

Experimenteller Teil.

Biologische Wirkungen.

a) Gesamtblut am Mäusedarm. Defibriniertes, mit destilliertem Wasser hämolysiertes, mindestens 24 Stunden altes Gesamtblut von Hammel,

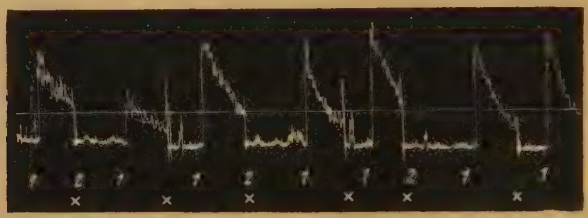


Abb. 1. *1* 0,2 Extrakt; *2* 0,5 Atropin $2{,}5 \cdot 10^{-4}$; × Auswaschen.

Rind, Ratte, Meerschweinchen und Mensch wurde am isolierten Mäusedarm (20 Versuche) untersucht. Es wurde dabei darauf geachtet, daß die Hypotonie des Hämolysates keinerlei Einfluß auf die Darmreaktion hatte. Die Verdünnung war in allen Fällen 1 : 1. Prinzipiell zeigte sich bei allen verwendeten Blutarten eine allerdings quantitativ unterschiedliche kontrahierende Wirkung am isolierten Darm, besonders am Mäusedarm, der dann auch in den nachfolgenden Versuchen hauptsächlich verwendet wurde. Bei frisch gewonnenem Blut überwog eine Tonussenkung, so daß der kontrahierende Effekt erst später und dann relativ abgeschwächt auftrat. Nach 24 Stunden Hämolyse bei Zimmertemperatur war keine Tonussenkung mehr zu erzielen. Die resultierende Kontraktion, verglichen mit frischem hämolysiertem Blut war wesentlich stärker. Bei mittlerer Kontraktionshöhe nach Dosen von 0,5 bis 1,0 ccm Hämolysat auf 20 ccm Badetyrode war die Amplitude der Pendelbewegung meist größer als in Ausgangslage. Atropinisierung (Endkonzentration 10^{-6}) verringerte die Kontraktionshöhe nur unwesentlich. Auffällig war dabei, daß bei einer Anzahl von Versuchen (8) diese Unempfindlichkeit gegen Atropin sich erst nach 3—4 Applikationen einstellte. Serum bzw. Plasma kontrahierten den Darm quali-

tativ in gleicher Weise wie die Hämolysate der durch scharfes Abzentrifugieren und Waschen gewonnenen zellulären Elemente. Serum bzw. Plasma war immer 10—20% weniger wirksam als das Blutkörperchenhämolysat. Infolge geringer Hämolyse war das Serum nie rein, so daß in späteren Versuchen immer von den Blutkörperchen ausgegangen wurde.

b) Blutextrakte am Mäusedarm. Die Untersuchung der Extrakte der Blutkörperchen, deren Herstellung später beschrieben wird, ergab aus 45 Versuchen folgendes Wirkungsbild. Nach der Applikation erfolgte nach einer Latenzzeit von 2—4 Sek. eine relativ langsame Kontraktion. Sowohl die Latenzzeit wie die Geschwindigkeit des Anstieges waren von der Konzentration abhängig. Bei kleinen und mittleren Dosen (entsprechend 0,5—1,0 ccm 1 : 1 mit destilliertem Wasser hämolysierter Blutkörperchen) nahm mit der Kontraktion die Amplitude der Pendelbewegung zu, bei großen Dosen (bis 2,0 ccm) war die Amplitude öfters verkleinert. Die Frequenz der Pendelbewegung wurde nicht beeinflußt. Nur gelegentlich war eine Irregularität oder ein Verschwinden der Peristaltik auf der Höhe der Kontraktion zu beobachten.

Die Latenzzeit verkürzt sich mit steigender Dosis. Ist die Kontraktionshöhe erreicht, so sinkt die Kurve je nach dem Ermüdungszustand des Darmes mehr oder weniger langsam ab, um sich meist für mehrere Minuten auf die halbe Höhe einzustellen. Atropinisiert (Endkonzentration 10^{-6}) zeigt der Darm das gleiche Wirkungsbild, quantitativ kommt gelegentlich ein Wirkungsverlust bis zu 20% vor, was sich durch Abstechen und Ausmessen der Kontraktionshöhe errechnen läßt. Wie bei Gesamtblut wird auch bei Verwendung von Extrakten eine Unempfindlichkeit gegen die Atropinhemmung häufig erst nach 3—4 Applikationen (5 Versuche), unterbrochen von ausgiebigem Spülen, erreicht.

Kokainisierung (Endkonzentration $5 \cdot 10^{-4}$—$2 \cdot 10^{-5}$) sensibilisiert den Darm gegen die Extraktwirkung nicht. Simon [32] fand, daß Kokainisierung den Darm gegen die kontrahierende Serumwirkung sensibilisiert. Nach Kendall [33] wurde in 10 Versuchen der Formoltest durchgeführt. Die Formollösung wurde in die Badeflüssigkeit gegeben, 1 Min. abgewartet, und dann der Extrakt appliziert. Bei einer Formolendkonzentration von $8 \cdot 10^{-3}$ waren die Extrakte am Mäusedarm immer völlig wirkungslos. Die oberste Grenze der Beeinflussung der Wirkung durch Formol lag bei $3 \cdot 10^{-5}$. Bei Konzentrationen bis zu $5 \cdot 10^{-4}$ wurde Tonus bzw. Peristaltik entweder abgeschwächt oder gar aufgehoben. Zusatz von Formol zu dem Extrakt machte die Wirkungsabschwächung weniger deutlich, sie kommt erst bei 1—$5 \cdot 10^{-4}$ zum Ausdruck.

Das Formol scheint also weniger die darmkontrahierende Substanz des Extraktes zu inaktivieren als vielmehr das reagierende Substrat, d. h. den Darm

gegen die Substanz unempfindlicher zu machen. Best und McHenry [34] und Zipf und Bartscher [35] kommen auf Grund ihrer Versuche mit Histamin zu dem gleichen Schluß. Als Stütze dieser Ansicht könnte noch dienen, daß die Wirkungsverminderung der Extrakte am Darm nach Formol abhängig ist von der Zeit der Formoleinwirkung. Wurde die in den Versuchen eingehaltene Zeit von 1 Min. zwischen den Applikationen auf 2 Min. ausgedehnt, so stieg die Empfindlichkeit des Testes, d. h. mit geringeren Formolkonzentrationen war ein gleicher Hemmungseffekt zu erzielen wie vorher mit größeren. Diese Versuche hatten nur orientierenden Charakter. Bei eingehenderer Untersuchung läßt sich möglicherweise hierauf basierend eine gesetzmäßige Relation zwischen Formol und der darmkontrahierenden Substanz finden, die quantitatives Arbeiten erlaubt.

Die darmkontrahierende Wirkung in Histamin bzw. Azetylcholinäquivalenten auszudrücken, wie das gelegentlich geschah, und so einen quantitativen Anhaltspunkt zu gewinnen, verbietet sich, da die Konzentrationswirkungskurven von Histamin, Azetylcholin und der darmkontrahierenden Lösung weitgehend divergieren und wie im Falle des Histamins am Mäusedarm überhaupt zu keinem Ergebnis führen.

Euler [36] fand, daß seine substanz-P-haltigen Präparate mit Trypsin verdaut jegliche für P typische Wirkung verlieren. Analog seinem Vorgehen wurden (in 5 Versuchen) die Blutextrakte mit einem trypsinhaltigen Pankreaspräparat (Pankreatin) bei 37° 24 Stunden lang im Brutschrank belassen. Pankreatin enthält nach Angaben der Hersteller neben geringeren Mengen Lipase und Amylase 72 Trypsineinheiten/g.

Zu 10 ccm Extrakt wurde 1 g Pankreatin gegegeben. Das p_H der Mischung lag bei 7. Zum Vergleich wurde das trypsinhaltige Präparat 15 Min. lang bei 100° inaktiviert und mit dem Extrakt zusammen wie oben behandelt. Getestet war die darmkontrahierende Wirkung der Extrakte nach Verdauung mit dem aktiven Präparat restlos verschwunden. Der Ansatz, der das inaktivierte Präparat enthielt, zeigte dagegen keinerlei Wirkungsverminderung. Das trypsinhaltige Präparat allein getestet hatte keine Eigenwirkung am Darm.

In einer weiteren Versuchsreihe (8 Versuche) wurden die Blutextrakte desaminiert und am Darm getestet. Zu 20 ccm des Extraktes wurde 1 ccm 5 n-$NaNO_2$ und 1 ccm 2n-HCl gegeben. Diese Mischung wurde 15 Min. gekocht. Danach wurde so lange Salzsäure zugesetzt, bis die Nitritreaktion nach Gries negativ war. Nach Beendigung der Desaminierung war die Lösung immer neutral. Durch Verdünnung wurde isotonisch gemacht. In Ermangelung eines Beckmann-Thermometers wurde die Isotonie über die osmotische Resistenz von Erythrozyten im Vergleichsversuch errechnet. Für Darmversuche ist die so eingestellte Isotonie hinreichend genau. Zwischen den normalen und den desaminierten Blutextrakten war keinerlei Wirkungsdifferenz nachweisbar.

c) Blutextrakte am Meerschweinchendarm. In 8 Versuchen wurde die Wirkung der Extrakte am atropinisierten Meerschweinchendarm nachgeprüft. Das Wirkungsbild war das gleiche wie beim Mäusedarm. Beim Vergleich der Extrakte mit den desaminierten Extrakten

ergab sich hier jedoch eine qualitative und quantitative Wirkungsdifferenz. Qualitativ war die Geschwindigkeit des Anstieges gegenüber dem unbehandelten Extrakt etwas langsamer. Quantitativ ergab sich nach Desaminierung ein Wirkungsverlust von 15—20%.

d) Durchströmungsversuche. An 18 Wintertemporarien und 14 Ratten wurden Durchströmungsversuche durchgeführt. Jedesmal wurden 0,2 ccm Extrakt 1 : 10 verdünnt (= 1 ccm hämolysiertes Blut) appliziert. Sowohl nach Frischblutextrakten wie nach Extrakten aus 24-Stunden-Dialysaten trat eine deutliche vasokonstriktorische Wirkung auf, bei der Ratte quantitativ deutlicher als beim Frosch. Durch Ergotamin

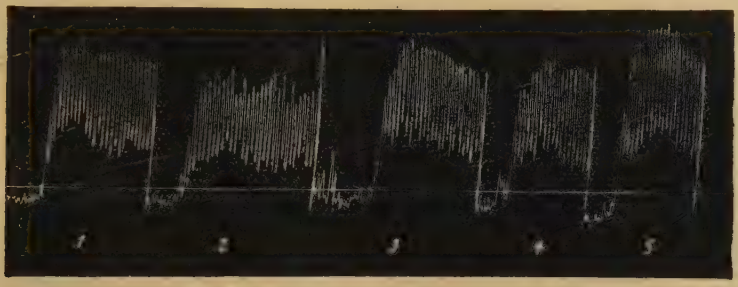


Abb. 2. *1* 0,1 Extrakt aus Dialysat; *2* 0,5 Atropin 10^{-4} + 0,1 Extrakt; *3* 0,1 Extrakt; *4* 0,1 desaminierter Extrakt; *5* 0,1 Extrakt.

0,1 ccm 10^{-4} erfolgte Abschwächung der vasokonstriktorischen Wirkung. Desaminierung zerstörte den vasokonstriktorischen Effekt am Frosch, während bei der Ratte nur eine Abschwächung erfolgte, trypsinverdaute Extrakte waren praktisch wirkungslos.

e) Versuche am Froschherzen. Am isolierten Froschherzen (8 Versuche) war weder mit Gesamtblut noch mit Extrakten eine irgendwie sichere Beeinflussung festzustellen. Hier wie auch beim Mäusedarm ist auf genaue Einstellung der Isotonie und Isohydrie besonderer Wert gelegt worden, um Scheinresultate zu vermeiden, die sich aus osmotischen oder p_H-Differenzen ergeben könnten.

f) Versuche an der isolierten Froschlunge. In 6 Versuchen mit Gesamtblut konnte keine Wirkung festgestellt werden, desgleichen nicht mit den geprüften Extrakten. Wurden die Extrakte auf das 5fache konzentriert, so ergab sich in 2 von 5 Versuchen eine mäßige nicht atropinfeste Kontraktion, die, wie Vergleichsprüfungen ergeben, nicht durch die Hypertonie der konzentrierten Extrakte hervorgerufen war.

g) Versuche am Blutdruck. In 5 Versuchen wurde die Blutdruckwirkung am atropinisierten, mit Äther narkotisierten Meerschweinchen nachgeprüft. Das Blut wurde mit Hirudin ungerinnbar gemacht, der Blutdruck mit einem m/3 sodagefüllten Quecksilbermanometer registriert. Die Extrakte erwiesen sich alle als depressorisch wirksam,

Tabelle 1. *Durchströmungsversuche.*

Nr.	Dosis Extr.	Anfangs gtt/Min.	Minimum gtt/Min.	Differenz %	Erholzeit Min.	Präparat
			Frosch (Wintertemporarien)			
8	0,1	28	22	22	8	Frischblut Hammel BK.
8a	0,1	26	20	23	5	Frischblut Rinder BK.
11	0,1	40	28	30	10	24 Stunden Dialysat Hammel BK.
11a	0,1	40	38	5	2	24 Stunden Dialysat trypsinverdautHBK.
14	0,1	20	20	—	—	24 Stunden Dialysat desaminiert HBK.
15	0,1	44	36	18	10	Ergot. + 24 Stunden Dialysat HBK.
			Ratte			
6	0,1	64	48	25	15	Frischblut HBK.
6a	0,1	58	32	45	20	Frischblut RBK.
11	0,1	52	46	12	12	24 Stunden Dialysat HBK.
11	0,1	68	64	6	7	24 Stunden Dialysat trypsinverdautHBK.
12	0,1	56	50	11	5	24 Stunden Dialysat desaminiert HBK.
13	0,1	48	42	13	5	Ergot. + 24 Stunden Dialysat HBK.

wobei zur Erzielung eines deutlichen depressorischen Effektes von etwa 30 mm Hg die 4—5fache Dosis benötigt wurde, die am Darm Kontraktion hervorruft. Die Applikation führte sofort zu einer steilen Blutdrucksenkung, die meist nach einer Minute wieder ausgeglichen war. Dabei ließ sich weder eine Veränderung der Herzfrequenz noch eine solche der Pulsamplitude im Sinne einer Vagusreizung feststellen. Bei hohem Ausgangsblutdruck von 90—110 mm Hg handelte es sich um eine reine Senkung ohne reaktive Blutdrucküberhöhung, bei niedrigem Ausgangsblutdruck dagegen von 40—50 mm Hg folgte der Senkung ein reaktiver Anstieg über die Ausgangslage. Kontrollen mit Tyrodeinjektion beeinflußten den Blutdruck nicht. Mit Trypsin (wie oben) verdaute Extrakte zeigten nur noch geringeren depressorischen Effekt bis 15 mm Hg, dem eine starke Steigerung folgte. Trypsinapplikation allein führte zu mäßiger Steigerung bis 20 mm Hg. Desaminierte Extrakte zeigten geringere, aber noch deutliche depressorische Wirkung (bis 15 mm Hg). Kochen in Alkali zerstörte die Wirkung völlig, Kochen in starker Säure zerstörte nur einen Teil der Wirkung (10—15 mm Hg weniger als bei unbehandelten Extrakten). Infolge Tiermangel konnten die Versuche

nur an Meerschweinchen durchgeführt werden. Ein Vergleich mit Histamin verbot sich von selbst infolge der bekannten Wirkung dieser Substanz auf die Bronchien des Meerschweinchens. Erwähnt sei noch, daß eine Füllung des Hg-Manometers mit Magnesiumsulfat nicht zum Ziel führt, da die Tiere noch spätestens 10 Min. unter langsamem Blutdruckabfall eingehen. Sodafüllung und Hirudinvorbehandlung bewährten sich hierbei.

Herstellung der Extrakte.

a) Fällungsmethoden. Von frischem bzw. 24 Stunden altem defibriniertem Blut wurde durch scharfes Zentrifugieren Serum von den Blutkörperchen getrennt. Da sich aus orientierenden Versuchen ergab, daß Blutkörperchenextrakte stärker wirken als Serumextrakte, wurden nur diese verarbeitet. Durch laufende Prüfungen am isolierten Mäusedarm erfolgte Kontrolle der gesuchten Wirkung. Zunächst geschah die Aufarbeitung nach den Angaben, nach denen Euler und Gaddum [87] ihre P-haltigen Organextrakte herstellten.

Das Substrat wurde mit der 6fachen Menge 96% Äthylalkohol versetzt, dem je 100 ccm 1 ccm n-Schwefelsäure beigegeben war. Der Zusatz von Säure bewährte sich hier insofern nicht, als bei der nachfolgenden Klarfiltration in 3 Versuchen Blutfarbstoff mit in das Filtrat überging. Daraufhin wurde ohne Säurezusatz gearbeitet. Die Mischung blieb unter gelegentlichen Umrühren mehrere Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Das Klarfiltrat wurde durch Ausschütteln mit Äther und Petroläther entfettet und im Vakuum bei 40° zur Trockne gebracht. Der gelbliche sirupöse Rückstand wurde in einer dem Ausgangsvolumen entsprechenden Menge destillierten Wassers gelöst und getestet. Dabei ergab sich ein etwa 80%iger Wirkungsverlust beim Vergleich mit der entsprechenden Menge Hämolysat.

Ein anderer Teil des Klarfiltrates wurde nach Entfettung ebenfalls im Vakuum eingeengt. Kurz vor der Trockne wurde mit Soda alkalisiert bis p_H 10, dann zur Trockne gebracht. Der sirupöse Rückstand wurde mit absolutem Alkohol extrahiert, der Alkohol verjagt, neutralisiert, mit destilliertem Wasser aufgenommen, isotonisch gemacht und getestet. Der Wirkungsverlust betrug zwischen 80 und 90%.

Die Lösung des Sirups in absolutem Alkohol wurde in einem anderen Versuch mit Schwefelsäure versetzt, bis das Filtrat keinen Niederschlag mehr gab. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Äther gewaschen, in destilliertem Wasser gelöst und getestet. Diese Aufarbeitung zeigte nur geringe Wirkung.

Wurde vor der Lösung des Sirups in absolutem Alkohol nicht alkalisch gemacht, so waren die Extrakte am Mäusedarm wirkungslos.

Fraktionierte Ausfällung mit Äther aus der alkoholischen Lösung führte zu Niederschlägen, die bei 25—30% Äther nur verschwindend geringe, nicht atropinfeste Kontraktionen hervorriefen. In einem Versuch trat in dieser Fraktion Tonussenkung auf. Erst bei Zusatz von 4—5fachem Volumen Äther war der Niederschlag zwar schwach aber deutlich wirksam.

Nachdem diese Methode bei Blut mit zu großen Verlusten arbeitete, wurde ebenfalls nach Euler und Gaddum mit gleichen Volumen 25% Trichloressigsäure enteiweißt und extrahiert, klar filtriert und wie oben angegeben, aufgearbeitet. Die Trichloressigsäure wurde durch Ausäthern entfernt. Hier waren die Ausbeuten ebenso schlecht wie im Vorhergehenden. Verwendung von nicht getrocknetem Azeton als Extraktionsmittel nach Trichloressigsäurefällung ergab keine

darmkontrahierende, sondern eine schwache tonussenkende Wirkung. Einfaches Kochen des Hämolysates und Klarfiltrieren führte zu etwas besseren Ausbeuten

Die Verluste bei dieser Art der Aufarbeitung scheinen hauptsächlich durch Adsorption an die bei der Enteiweißung entstehenden Niederschläge bedingt zu sein. Daß der gesuchte Stoff sehr leicht adsorbierbar ist, geht, abgesehen von verschiedenen Literaturstellen, aus der Tatsache hervor, daß wirksame Extrakte, mit 0,5—1,0 g-% Tierkohle geschüttelt und filtriert, jede Wirkung vermissen lassen, während, wie orientierende Versuche zeigen, Histamin bzw. Azetylcholin bei weitem nicht in solchem Umfange unwirksam werden. Die adsorptive Bindung an Tierkohle ist sehr fest. Selbst durch 24 Stunden Extraktion im Soxhletapparat mit Äthylalkohol bei verschiedenem p_H war eine Elution unmöglich.

b) Dialyse. Um Fällungen zu vermeiden, wurden in den folgenden Versuchen die Ausgangssubstrate durch Cellophan gegen destilliertes Wasser bei Zimmertemperatur dialysiert. Dabei konnte von einer vorausgehenden Hämolyse abgesehen werden, da diese nur zu einer Verminderung der Ausbeute führte. Nach 24 Stunden Dialyse war die Hämolyse sowieso vollständig. Immer ergab sich dem Verhältnis von Innen- zu Außenflüssigkeit entsprechend eine quantitative Ausbeute. Diese Methode hat einerseits den Vorteil, Adsorptionsverluste zu vermeiden und andererseits die evtl. noch störenden Adenylderivate auszuschalten. Die der Dialyse parallelgehenden autolytischen Vorgänge spalten den größten Teil der Adenylderivate zu unwirksamen Verbindungen, während die gesuchte Substanz nicht angegriffen wird. Durch häufiges Wechseln der Außenflüssigkeit konnte die darmkontrahierende Wirkung des Ausgangssubstrates zum Verschwinden gebracht werden. Die Dialysate können ohne Wirkungsverlust bei p_H 4—5 und 100° zur Trockne eingedampft werden. Auch hier bleibt ein gelblicher Sirup zurück. Es wurde immer im Verhältnis 1:1 dialysiert, so daß 50% der Wirkung in der Außenflüssigkeit vorlagen. Das beim Eindampfen kurz vor der Trockne alkalisch gemachte Dialysat wurde nach der Trocknung mit absolutem Alkohol extrahiert. Mit dem Dialysat verglichen, konnte so bis 70% der gesuchten Wirkung ausgezogen werden. Bei Extraktion mit Methylalkohol (2 Ansätze) war das Ergebnis noch etwas besser (Ausbeute bis 80%). Fällungen mit Schwefelsäure oder Äther führten auch hier zu kristallinen Niederschlägen, die jedoch nur 20—30% der Wirkung enthielten. Wenn auf weitere Ätherzugabe kein Niederschlag mehr entstand, wurde das alkoholisch-ätherische Klarfiltrat zur Trockne gebracht. Der Rückstand in Wasser aufgenommen war am Darm noch stark wirksam, so daß geschlossen werden kann, daß die gesuchte Wirkung nur adsorptiv in die Ätherfällung geht.

c) Salzfällung. Mit dem von Euler neuerdings angegebenen Aussalzungsverfahren mit Ammonsulfat war in den alkoholischen Extrakten kein nennenswerter Niederschlag zu erzielen. In Filtraten, die nach dem Vorgehen Eulers sich durch einfaches Kochen des Ausgangssubstrates ergaben, entstand wohl ein Niederschlag mit Ammonsulfat, der aber schon so wenig wirksam war, daß eine weitere Aufarbeitung nicht lohnte, um so mehr, als dann mit Mengen gearbeitet werden müßte, die derzeit nicht zu beschaffen sind und für die hier jegliche apparative Vorbedingung fehlte.

d) Basenfällungsmittel. Mit verschiedenen Basenfällungsmitteln wie Phosphorwolframsäure, Sublimat und Reineckesalz ergaben sich aus dem Dialysat Niederschläge, die auf bekannte Weise zersetzt, alle nur relativ geringe und nicht konstante Wirkung zeigten. Daß es sich hier auch nur um adsorptive Vorgänge handelt, dürfte daraus hervorgehen, daß trotz Überschuß an Basefällungsmitteln der größere Teil der Wirkung in der Lösung blieb. Bei Reineckesalz läßt sich das besonders deutlich nachweisen, da noch deutlich gefärbte Lösungen von Reinecke-

salz den Mäusedarm nicht beeinflussen. Die Reinekate waren an sich am stärksten wirksam, waren aber nicht atropinresistent.

e) Organische Extraktionsmittel. Extraktionsverfahren mit anderen Lösungsmitteln wie Benzol, Chloroform führten nicht zum Ziel. Die Extrahierbarkeit des gesuchten Stoffes mit homologen Alkoholen nimmt mit steigender C-Zahl ab.

Tabelle 2. *Extrahierbarkeit der Wirkung bei p_H 10 mit homologen Alkoholen.*

Methylalkohol	50—55%
Äthylalkohol	50%
Isopropylalkohol	45%
n-Butylalkohol	25%
Isoamylalkohol	17%

f) Durchgeführtes Verfahren. Als für Blut unter den obwaltenden Umständen zweckmäßigstes Verfahren hat sich die Dialyse erwiesen mit Eindampfen in leicht sauren Milieu, Extraktion in alkalischem Milieu mit absolutem Äthyl- oder Methylalkohol, Vorfällung mit 25% Äther, um einen Teil der nicht atropinfesten Fraktion zu entfernen, dann Eindampfen des Alkohol-Äthergemisches und Aufnehmen in destilliertem Wasser, Kontrolle der Isotonie. Die Konzentration wurde meist so eingestellt, daß 0,1 ccm Extrakt 1 ccm 1 : 1 hämolysierter Blutkörperchen entsprach. Bei p_H 5—6 waren die so hergestellten Stammextrakte ohne wesentlichen Wirkungsverlust im Eisschrank haltbar. Durch Verdünnen mit Tyrode wurde dann die für den Versuch jeweils benötigte Lösung frisch hergestellt.

Differenzierung der Wirkung.

Bei einer genaueren Differenzierung der Wirkung unreiner Extrakte ist es unumgänglich notwendig, sämtliche Substanzen mit einzubeziehen, die irgendwie biologische Wirkungen erwarten lassen und von denen bekannt ist, daß sie im vorliegenden Extrakt enthalten sein könnten. Zu einer solchen Differenzierung der Blutextrakte scheint der Mäusedarm besonders geeignet, weil er, richtig gehandhabt, ein äußerst empfindliches Reagens auf die vorliegenden Extrakte darstellt. Zu beachten ist dabei, daß Sensibilisierungserscheinungen, wie sie vor allem bei Azetylcholintestung vorkommen, auch bei der Prüfung der Blutextrakte öfters beobachtet wurden. Die Empfindlichkeit des Mäusedarmes gegen die gesuchte Wirkung scheint besonders groß, seine Empfindlichkeit gegen fast alle als störend in Frage kommenden Substanzen dagegen ist gering, mit Ausnahme der Cholinester. Adenylderivate können auf Grund ihrer, der gesuchten Wirkung entgegengesetzter Eigenschaften um so mehr ausgeschlossen werden, als die Aufarbeitung durch Dialyse den größeren Teil dieser Substanzen zerstört. Auch das Eindampfen der Dialysate bei saurer Reaktion dürfte die Hydrolyse der Adenylderivate sicherstellen. Ein weiterer Beweis für das Fehlen wirksamer Adenylsäuremengen im Dialysat dürfte die Tatsache sein, daß bei längerem Kochen (1 Stunde bei p_H 3) keine Steigerung der darmkontrahierenden Wirkung eintritt. Die Abwesenheit

von Histamin in störenden Mengen wurde durch verschiedene Reaktionen dargetan. Der negative Ausfall der dreifachen Reaktion auf der Haut weist darauf hin, daß, weniger als 10^{-5} Histamin im Extrakt enthalten sind. Nach Desaminierung tritt am Mäusedarm keine Wirkungsverminderung auf. Am Meerschweinchendarm dagegen war eine solche von etwa 20% nachzuweisen. An dem gleichen Objekt ausgetestet entspräche das einem Histamingehalt des Hammel- bzw. Rinderblutes (Blutkörperchen) von 0,05—0,1 γ/ccm. Da aber der Mäusedarm gegen Histaminkonzentrationen unter 10^{-4} im allgemeinen unempfindlich ist, schließt sich eine Störung von seiten der genannten Histaminmenge aus. Die Extrakte geben alle mit der Paulyschen Reaktion[38] (Sulfanilsäure und $NaNO_2$ in alkalischem Milieu) eine Färbung.

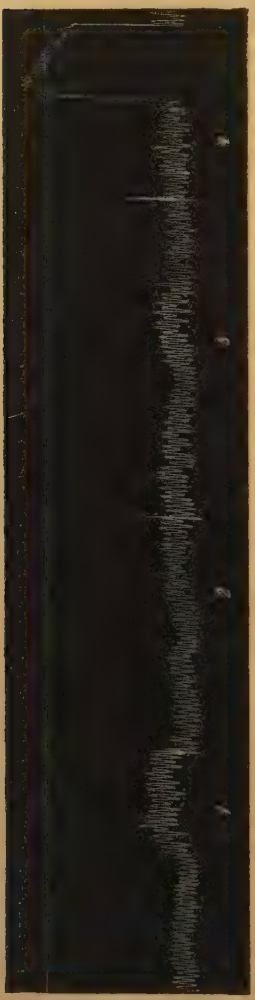


Abb. 3. *1* 2,0 Kreatinin $2 \cdot 10^{-4}$; *2* 1,0 Kreatinin $2 \cdot 10^{-4}$; *3* 1,0 Kreatinin $2 \cdot 10^{-4}$; *4* 0,2 Extrakt.

Schon grobe Vergleiche der Farbwerte zeigen besonders in Verdünnungsreihen eine grundsätzliche Verschiedenheit gegenüber der Histaminreaktion. Histamin liefert mit der Paulyschen Reaktion rote Farbtöne mit einem Absorptionsmaximum bei 650 mμ. Die geprüften Extrakte geben rein gelbe Farbtöne mit einem Maximum bei 550 mμ. Damit kann allerdings nur Histamin ausgeschlossen werden in Konzentrationen bis $2 \cdot 10^{-5}$. Da aber verschiedene andere im Blut vorkommende Substanzen wie Tyrosin und Tyramin mit der gleichen Reaktion ähnliche Farbwerte geben, so läßt sie sich nur zum Ausschluß von Histamin verwenden. Die relativ geringe Eigenfarbe der Reaktion im Leerversuch, die ebenfalls im Gelb liegt, muß bei der Prüfung abgezogen werden. Quantitative Messungen lassen sich mit dieser Methode nicht durchführen, da der gebildete Farbstoff nicht stabil ist. Tyramin, das nach Freund[39] ebenfalls Spätgiftwirkung haben soll, läßt sich trotz zweifelhafter Paulyscher Reaktion ausschließen, da es nur in Konzentrationen bis 10^{-5} den Darm beeinflußt, und zwar im Sinne einer Tonussenkung. Daß Kreatinin (im Gegensatz zu Kahlson[40]) für die Kontraktion des Mäusedarmes im vorliegenden Fall ohne Bedeutung ist, geht daraus hervor, daß nur

Endkonzentrationen von $5 \cdot 10^{-4}$ und stärker eine geringfügige Kontraktion hervorrufen. Der Ablauf der Kontraktion nach Gabe von Extrakten ähnelt zwar stark dem durch Kreatinin erzielten. Der negative Ausfall der JAFFÉschen Reaktion (Empfindlichkeit bis 10^{-6}) läßt jedoch Kreatinin sicher ausschließen.

Cholin ist in den Extrakten zweifellos in wechselnden Mengen vorhanden. Der gelegentliche Wirkungsverlust nach Atropinisierung spricht deutlich dafür. Beweisender dürfte allerdings sein, daß bei Extrakten mit besonders großer Atropinempfindlichkeit durch Azetylierung mit Essigsäureanhydrid eine beträchtliche Wirkungssteigerung und Steigerung der Atropinempfindlichkeit zu erzielen war. An den isolierten Froschlungen (von Winterfröschen), dem derzeit empfindlichsten biologischen Test auf Cholin bzw. Cholinester (Empfindlichkeit bis 10^{-14}), wurde unregelmäßig eine geringe nicht atropinfeste Kontraktion durch die Extrakte hervorgerufen.

Durch Kochen in leicht saurem Milieu (p_H 4) wird die Wirkung der Extrakte nicht beeinflußt. 20 Min. Kochen bei p_H 11—12 hebt den darmkontrahierenden Effekt restlos auf. Aber auch eine Tonussenkung fehlte nach derartiger Behandlung der Extrakte. Lediglich wenn Frischblut mit einer der Eiweißfällungsmethoden sofort aufgearbeitet wurde, konnte besonders nach Extraktion mit wäßrigem Alkohol bzw. Azeton eine Tonussenkung regelmäßig beobachtet werden. Bei Verarbeitung von Dialysaten fehlte sie immer. 60 Min. Kochen bei p_H 1—2 zerstörte die kontrahierende Wirkung ebenfalls. Bleiben die Extrakte bei p_H 8 in Zimmertemperatur stehen, so verlieren sie nach 1 Woche 50% der Wirkung, nach 2 Wochen war kein Effekt mehr nachweisbar. Sämtliche Extrakte aus Dialysaten verhalten sich qualitativ gleich. Quantitativ scheint Hammelblut mehr von der gesuchten Wirkung zu enthalten als Rinder-, Meerschweinchen- oder Menschenblut.

Die Durchströmungsversuche geben wenig Aufschluß über die Reinheit bzw. die störenden Beimengungen der Blutextrakte. Die untersuchten Extrakte kontrahieren alle die Gefäße. Das wechselnde Ergebnis nach Desaminierung läßt keine weiteren Schlüsse auf eine allfällige Aminwirkung zu. Die Wirkungslosigkeit der Extrakte nach Trypsinverdauung läßt an eine Eiweißkomponente denken. So ließe sich dann auch ein Anhaltspunkt für die verschiedenen Angaben über die Dialysierbarkeit der vasokonstriktorischen Wirkung bei verschiedenen Arten von Blut finden. Die Froschherzversuche zeigen das Fehlen störender Substanzen wie Adenylsäure und Cholin in wirksamen Mengen an. Sonst geben sie keine weitere Auskunft.

Die Blutdruckversuche zeigen eine reine depressorische Wirkung an. Die Ergebnisse der Trypsinverdauung weisen auf einen aktiven Eiweißkörper hin, lassen aber anscheinend erkennen, daß zumindest am Meer-

schweinchenblutdruck die Extrakte nicht wirkungsrein sind. Die Blutdrucksteigerung, die bei niedrigem Blutdruck nach Gaben von unbehandeltem Extrakt sekundär auftritt, ist bei trpysinbehandelten Extrakten stärker ausgeprägt. Möglicherweise macht sich hier eine durch Eiweißverdauung nicht zerstörbare oder neugebildete Substanz bemerkbar. Eine Cholin- bzw. Cholinesterwirkung war nach Atropinisierung immer ausgeschlossen. Wie bei den Darmversuchen verbietet sich durch die Art der Aufarbeitung der Extrakte ein Einfluß von Adenylderivaten auf den Blutdruck. Daß Histamin in geringen Mengen im Extrakt enthalten ist, geht aus den Desaminierungsversuchen hervor, sowie aus der Tatsache, daß nach Kochen in starker Säure ein Teil der depressorischen Wirkung erhalten bleibt. Die Ergebnisse der Blutdruckversuche, die aus Tiermangel lediglich orientierenden Charakter haben konnten, stehen im Gegensatz zu dem von Zipf und Hülsmeyer beobachteten Fehlen einer Blutdruckwirkung ihrer Extrakte, was wohl an der Art der von diesen Autoren angewendeten Aufarbeitungsmethodik liegt, wie schon vorher erwähnt.

Diese Differenzierung zeigt, daß sowohl Darmkontraktion wie Blutdrucksenkung nicht von den als störend in Frage kommenden Stoffen ausgehen können. Sie zeigt weiter, daß die genannten Eigenschaften bei verschiedenartigster Behandlung in gleicher Weise erhalten bleiben bzw. zerstört werden, daß diese Eigenschaften also wahrscheinlich als zu einer einzigen Substanz gehörig zu betrachten sind, zur Substanz P von Euler und Gaddum.

Diese Substanz eröffnet eine Reihe pharmakologisch gleich oder ähnlich wirkender Körper aus Organextrakten wie Vesiglandin, Prostaglandin v. Eulers bzw. Goldblatts, die Thrombovasine Simons, die von Secker, Feldberg und Guimarais untersuchten Wirkstoffe des Speichels u. a. Diese chemisch, physikalisch und biologisch nur wenig verschiedenen Körper kommen den biogenen Aminen nahe, sind aber bei fehlender Basennatur hier nicht einzugliedern. Offensichtlich handelt es sich um eine von den biogenen Aminen und den Hormonen völlig verschiedene neue Wirkstoffgruppe, deren gemeinsames Kennzeichen eine selbst in niedrigster Konzentration noch sehr starke Wirkung auf bestimmte vegetativ innervierte Substrate ist, ohne daß der Reiz über den vago-sympathischen Apparat verläuft. Wenn Euler der Substanz P die Rolle eines Darmhormons an Stelle des Le Heuxschen Cholins zuspricht, so faßt er den Funktionskreis dieser anscheinend im Organismus ubiquitären Substanz sicher zu eng. Der Nachweis der Substanz P in allen anderen Organen, die positive Beantwortung der vorliegenden Fragestellung läßt eine umfassendere Bedeutung der Substanz P vermuten, ohne daß allerdings Sicheres darüber bis jetzt ausgesagt werden könnte.

Zusammenfassung.

Serum und Blutkörperchen von defibriniertem Hammel-, Rinder-, Meerschweinchen- und Menschenblut, und die daraus hergestellten Extrakte kontrahieren den isolierten Ratten-, Meerschweinchen- und Mäusedarm, senken den Blutdruck und kontrahieren isolierte durchströmte Gefäße.

Die Wirkung auf Darm und Blutdruck ist atropinfest. Durch Kochen in Alkali bzw. starker Säure, sowie durch Trypsinverdauung wird die Wirkung zerstört. Durch Formolzusatz zum Testobjekt ist sie reversibel hemmbar.

Durch Desaminierung wird die Darm- und Blutdruckwirkung nicht beeinträchtigt.

Am durchströmten Gefäßpräparat wird die Wirkung durch Kochen in Alkali völlig, durch Kochen in starker Säure und durch Desaminierung nur teilweise zerstört. Ergotamin schwächt die Vasokonstriktion ab.

Am isolierten Froschherzen und an der Froschlunge sind keine Wirkungen nachweisbar.

Die Extrakte enthalten geringe, nicht störende Beimengungen von Histamin und Cholin. Sie geben eine Paulysche Reaktion mit einem Absorptionsmaximum bei 550 mμ (Histamin eine solche mit einem Maximum bei 650 mμ).

Angaben über die Herstellung von Extrakte und das Verhalten der wirksamen Komponente bezüglich Löslichkeit, Fällung, Dialyse, Absorption und Haltbarkeit werden gemacht.

Die angeführten Befunde sprechen dafür, daß die Substanz P von v. Euler und Gaddum im Blute und in den Blutextrakten in biologisch faßbaren Mengen enthalten, und eine wesentliche Komponente der Spätgiftwirkung ist.

Mit den derzeitigen Methoden ist Substanz P aus dem Blute weder rein darzustellen, noch quantitativ zu erfassen.

Die Möglichkeit einer quantitativen Erfassung von Substanz P mit dem Formoltest am isolierten Mäusedarm wird erörtert.

Literatur.

[1] Läwen, A.: Arch. exper. Path. (D.) **51**, 415 (1904). — [2] Trendelenburg, P.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **63**, 161 (1910). — [3] O'Connor, J. M.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **67**, 95 (1912). — [4] Trendelenburg, P.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **79**, 154 (1916). — [5] Stewart, G. N. u. Zucker: J. exper. Med. (Am.) **17**, 152 (1913). — [6] Haake, E.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **150**, 119 (1933). — [7] Borgert u. Keitel: Biochem. Z. **175**, 1 (1926). — [8] Heymann, W.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **125**, 77 (1927). — [9] Simon, A.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **187**, 678 (1937). — [10] Freund, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **86**, 266; **88**, 39 (1920). — [11] Cannon and La Paz: Amer. J. Physiol. **28**, 64 (1911). —

[12] O'Connor, J. M.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **67,** 95 (1912). — [13] Stewart, G. N.: J. exper. Med. (Am.) **17,** 152 (1913). — [14] Freund, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **88, 39** (1920). — [15] Zipf, G.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **160**, 579 (1931). — [16] Dittler, R.: Pflügers Arch. **157**, 453 (1914). — Z. Biol. **68**, 223 (1918). — [17] Zipf, K.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **160,** 579 (1931). — [18] Haake, E.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **150,** 119 (1930). — [19] Guttentag, E. O.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **162**, 727 (1931). — [20] Jürgensohn, E.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **162**, 739 (1931). — [21] Zipf u. Hülsmeyer: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **173**, 1 (1933). — [22] Barsoum and Gaddum: J. Physiol. (Brit.) **85**, 1 (1935). — [23] Kapfhammer u. Bischoff: Z. physiol. Chem. **191**, 179 (1930). — [24] Chang and Gaddum: J. Physiol. (Brit.) **79**, 255 (1933). — [25] Gollwitz-Maier: K., Naunyn-Schmiedebergs Arch. **174**, 456 (1934). — [26] Kahlson, G.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **175**, 198 (1934). — [27] Euler, U. S. v.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **181**, 181 (1936). — [28] Zipf u. Hülsmeyer: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **173,** 1 (1933). — [29] Euler, v. and Gaddum: J. Physiol. (Brit.) **72**, 74 (1931). — [30] Gaddum u. Schild: J. Physiol. (Brit.) **83**, 1 (1934). — [31] Zipf u. Hülsmeyer: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **173,** 1 (1933). — [32] Simon, A.: Naunyn- Schmiedebergs Arch. **190**, 274 (1938). — [33] Kendall, A. J.: J. infect. Dis. (Am.) **40**, 689 (1927); **41**, 143 (1927); **47**, 267 (1930). — [34] Best and McHenry: J. Physiol. (Brit.) **70**, 349 (1930). — [35] Zipf u. Bartscher: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **171**, 592 (1933). — [36] Euler, U. S. v.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **181,** 181 (1936). — [37] Euler, v. and Gaddum: J. Physiol. (Brit.) **72,** 74 (1931). — [38] Guggenheim, M.: Die biogenen Amine, S. 231. Berlin: Springer 1924. — [39] Freund, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **180**, 189 (1936). — [40] Kahlson, G.: Naunyn- Schmiedebergs Arch. **175,** 198 (1934).

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität Greifswald und dem Diabetikerheim und Forschungsinstitut für Diabetes in Garz/Rügen (Direktor: Prof. Dr. G. Katsch).

Die Wirkung des Insulins auf Bulbusdruck und Quaddelresorptionszeit.

Von

Dr. Wulf Lübken.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 4. Juni 1947.)

Beziehungen des Insulins zum Wasserhaushalt des Körpers wurden hinsichtlich der wasserbindenden Kraft des Hormons wohl zuerst im Jahre 1923 von Blum und Schwab[1] gefunden. Sie beobachteten durch den Wirkstoff hervorgerufene Ödeme bei insulinspritzenden Diabetikern. In der Folge würde die Ödeme oder Ödemneigung bewirkende Eigenschaft des Insulins häufig beobachtet (v. d. Bergh[2], v. Noorden und Isaac[3], Bertram[4], Grafe[5], Klein[6] u. v. a.).

Umber[7] sah Insulinödeme mit Wasserretention bis zu 10 Litern besonders bei polyurischen Diabetikern, die vorher durch schlechte Stoffwechsellage entwässert waren. Ja, eine Gewichtszunahme um 16 kg in einer Woche wurde beobachtet, der nach entwässernden Maßnahmen eine Gewichtsabnahme um 9 kg in 10 Tagen folgte (Reinwein[8]). Nach v. Noorden[3] besteht daneben eine Neigung des Diabetikers zu Wasserretention besonders in der Phase der Stoffwechselbesserung. Klein[9] wies die wasserbindende Kraft des Insulins im akuten Wasserbelastungsversuch bei Zuckerkranken nach, wobei allerdings die Ergebnisse je nach der Stoffwechsellage unterschiedlich waren. Klein und Rischawy[10] zeigten, daß Insulin auch bei gesunden Menschen, bei gleichzeitiger Wassergabe, zunächst eine Hemmung der Diurese verursacht, die dann oft in eine starke Wasserausscheidung umschlägt.

Das Hormon bewirkt eine Eindickung des Blutes mit ansteigenden Hämoglobinwerten und Anstieg des Plasmatrockenrückstandes (Klein[11], Villa[12, 13]). Beim Diabetiker entsteht eine Diuresehemmung, wobei die Plasmamenge durch

---

[1] Blum u. Schwab: Presse méd. **1923**, 637. — [2] Bergh, v. d.: Vorlesungen über die Zuckerkrankheit. Berlin: Springer 1926. — [3] Noorden, v. u. Isaac: Die Zuckerkrankheit und ihre Behandlung. Berlin: Springer 1927. — [4] Bertram: Die Zuckerkrankheit. Leipzig: Georg Thieme 1939. — [5] Grafe: Handbuch der inneren Medizin, 3. Aufl., Bd. VI/2, S. 583. — [6] Klein: Z. klin. Med. **100**, 458 (1924). — [7] Umber: Ernährung und Stoffwechselkrankheiten, 3. Aufl. Berlin u. Wien: Urban & Schwarzenberg 1925. — [8] Reinwein: Dtsch. med. Wschr. **1929 I**, 951. — [9] Klein: Med. Klin. **21**, 1116 (1925). — [10] Klein u. Rischawy: Z. exper. Med. **1926**, 652. — [11] Klein: Med. Wschr. **1925**, 506. — [12] Villa: Boll Soc. med.-chir. Pavia **36**, 239 (1924). — [13] Villa: Klin. Wschr. **1924 II**, 1949.

Abwanderung von Wasser und Kochsalz ins Gewebe vermindert wird. Die Verminderung geht hierbei der Insulindosis etwa parallel und gleicht sich mit der Kompensation des Stoffwechsels aus (Gülzow[14]). H. Marx[15] fand bei Diabetikern eine stärkere Verminderung der zirkulierenden Plasmamenge als bei Gesunden.

Villa[12] meint, daß vom Insulin eine ganz allgemeine Zellwirkung ausgehe, da gleichzeitig Refraktion, Viskosität und Eiweißgehalt im Serum zunehmen. Nach Klein[11] kommt die Wasserretention dadurch zustande, daß entweder das Insulin den Hydratationsdruck gewisser Kolloide erhöht oder aber, daß die Gewebe nach Wiedererlangung ihres Glykogenspeicherungsvermögens ein noch höheres Wasserbindungsvermögen als normal erreichen. H. Marx macht ebenfalls die wasserbindende Kraft des unter Insulinwirkung gebildeten Glykogens für den Wasserabstrom aus dem Blut verantwortlich. Weiterhin bestimmen das Absinken des Kochsalzes sowie des anorganischen Phosphates im Blut die Schwankungen des Wasserhaushaltes.

Es ist also insgesamt die hydropigene Kraft des Insulins eine gesicherte Tatsache, wobei wir uns hinsichtlich des Angriffspunktes seiner Wirksamkeit an Marx[15] anschließen.

Wir stellten uns die Aufgabe, die Ödembereitschaft bei insulinspritzenden Diabetikern im akuten Insulinbelastungsversuch zu prüfen. Es interessierte uns hierbei die Stärke der Reaktion des diabetischen Organismus auf eine einmalige Hormonzuführung, sowie der zeitliche Wirkungseintritt und die Dauer der hydropigenen Kraft. Wir bestimmten die Wirkung auf den Körper mit der Messung des Bulbusdruckes (BD) und weiterhin mit der Feststellung der Quaddelresorptionszeit (QRZ) nach McClure und Aldrich[16, 17].

1. Schwankungen des Augendrucks beim Diabetes wurden zuerst von Krause[18] festgestellt, der auf die Hypotonie der Bulbi im Coma diabeticum hinwies, ein Befund, der später oft bestätigt wurde (Hertel[19], Heine[20]). Das Hypotoniesymptom findet sich in gleicher Weise beim experimentellen Pankreas- und Phlorrhizindiabetes (Ascher[21]). Eine direkte Abhängigkeit zwischen Blutzucker und Augendruck besteht nach E. Marx[22] nicht.

Nach Ascher[21] beschleunigt Insulin den Druckanstieg der Bulbi in Parallele zur Wasserretention in Leber und Muskulatur, ein Vorgang, der sein pathophysiologisches Gegenstück in der Wasserverarmung der Gewebe und gleichzeitiger Hypotonie der Bulbi bei Insulinmangel im Coma diabeticum hat. Nach Ed. Grafe[23] ist „die Hypotonie der Bulbi ein kolloidchemisches Phänomen, bedingt durch Flüssigkeitsabwanderung aus dem Bulbus (Glaskörperentquellung)". Der feinere Mechanismus sei unbekannt. Es erscheint uns die naheliegende Erklärung zu sein, daß die Augendruckschwankungen sich etwa in Parallele mit den Wasserbewegungen der Gewebe (Extrazellulärräume) verschieben. Danach

[14] Gülzow: Dtsch. Arch. klin. Med. **192**, 65 (1944). — [15] Marx, H.: Der Wasserhaushalt. Berlin: Springer 1935. — [16] McClure u. Aldrich: J. amer. med. Assoc. **81**, 239 (1934). — [17] McClure u. Aldrich: Klin. Wschr. **1927 I**, 1198. — [18] Krause: Verh. dtsch. Kongr. inn. Med. **21**, 439 (1904). — [19] Hertel: Münch. med. Wschr. **1913**, 22. — [20] Heine: Krankheiten des Auges im Zusammenhang mit der inneren Medizin. Berlin 1921. — [21] Ascher: Tagg dtsch. Ophthalmol. Ges. Heidelberg 1925: Über Augendruck bei Zuckerkranken. — [22] Marx, E.: Ndld. Tschr. Geneesk. **69**, 1397 (1925). — [23] Grafe, Ed.: In v. Noorden-Isaac: Die Zuckerkrankheit, 8. Aufl. Berlin: Springer 1927.

ist zu erwarten, daß der BD zum Nachweis latenter Ödeme oder einer Ödembereitschaft dienen kann.

2. Die Resorptionszeit einer intrakutanen Quaddel physiologischer Kochsalzlösung ist beim Ödematösen oder Ödembereiten gegenüber dem Gesunden verkürzt. Sie wird deswegen zur Feststellung einer Ödemneigung verwandt. Bei Hunden mit Plasmapharesеödeme ist die QRZ mit oder kurz vor Auftreten der Ödeme bis zum Ende der Ödemausschwemmung oder sogar darüber hinaus zum Teil erheblich verkürzt (Gülzow [14], s. dort auch weitere Literatur). Bei insulinspritzenden Diabetikern wurden bei auftretenden Insulinödemen dieselben Beobachtungen gemacht (Hashimoto und Aoki [24], Gülzow [14], Zothe [25]). Die Genese des Ödems spielt eine unwesentliche Rolle, es wurde eine Verkürzung bei Insulin-Nieren-Kreislauf-Ödemen gefunden. Auch auf Adrenalin verkürzt sich die QRZ, eine Tatsache, der wir im folgenden noch unsere Aufmerksamkeit schenken werden. Ausnahmen bilden die Inanitions- und Kachexieödeme (Lymphbahninsuffizienz: Gülzow [14]) und die Ödeme nach längerer Nebennierenrindenhormonzuführung.

Nach Zothe [25] [26] sind an der verkürzten QRZ die Hautlymphbahnen maßgebend beteiligt; er hält für das wesentliche Zeichen der Ödementstehung die Beschleunigung der kutanen Lymphstromgeschwindigkeit. „Die Ansammlung extrazellulärer Flüssigkeit beim Ödem führt zum vermehrten Lymphabfluß durch die Haut. Die Kompensation des Ödems gelingt dadurch jedoch nicht, da die Lymphbahnen für den Abtransport größerer Flüssigkeitsmengen ungeeignet sind" (Gülzow [14]). Es ist also die Verkürzung der QRZ ein sekundärer Vorgang, der jedoch zur Bestimmung einer Ödembereitschaft bzw. latenter Ödeme geeignet erscheint.

Methodik der Untersuchungen.

a) Blutzuckerbestimmung: Der Blutzucker wurde kapillar nach Hagedorn-Jensen bestimmt.

b) Bulbusdruck: Der BD wurde mittels des Tonometers nach Schiötz festgestellt, wobei an beiden Augen mit verschiedenen Gewichten (5,5; 7,5 und 10 g) mehrere Messungen durchgeführt wurden. Der mittlere Wert aller Messungen wurde als tatsächlicher Augendruck registriert. Dabei unterschieden sich die beiden Augen nicht, oder in so geringem Umfange, daß sich eine gesonderte Aufzeichnung stets erübrigte. Es hat sich uns bei den Messungen ergeben, daß die Fehlerbreite der Methode etwa um 1 mm Hg anzunehmen ist.

c) Quaddelresorptionszeit: Mit 0,9%iger Kochsalzlösung wurden jeweils 3 Quaddeln zu 0,2 ccm intrakutan in die Brusthaut injiziert. Das Verschwinden der Quaddeln wurde durch Inspektion und Palpation festgestellt. Die zeitlichen Werte sind dabei selbstverständlich mit einem individuellen Fehler der Ablesung behaftet, der aber bei derselben Person um die gleichen Werte schwanken dürfte. Es erschien uns der absolute Wert überdies weniger beachtlich, als vielmehr die Veränderungen dieses Wertes.

[24] Hashimoto u. Aoki: Mitt. med. Ges. Tokyo (dtsch. Zusammenfassung) **47**, 1547 (1933). — [25] Zothe: Arch. klin. Med. **189**, 253 (1942). — [26] Zothe: Med. Welt **1940 I**, 705.

d) Insulin: Die Insulinbelastung wurde mit 6 oder 8 E Altinsulin durchgeführt. So niedrige Insulindosen wurden gewählt, um den physiologischen Verhältnissen der Insulinzuführung möglichst nahezukommen. Im größten Teil der Fälle wurde deutsches (Degewop), bei einigen Patienten jedoch auch amerikanisches (Lilly) Altinsulin verwandt. Da letzteres aus nach Abel[27] kristallisiertem Insulin hergestellt wird, konnten evtl. Effekte durch Verunreinigung des deutschen Insulins ausgeschaltet werden.

e) Versuchsanordnung. Zunächst wurden bei den Patienten die Nüchternwerte des Blutzuckers, des BD und der QRZ bestimmt. Dann wurde Insulin injiziert. Die Blutzuckerwerte wurden dann, wie bei einer gewöhnlichen Insulinbelastung, halbstündlich bis insgesamt 5 Stunden nach der Hormoninjektion ermittelt. Die Werte des BD und der QRZ wurden jeweils $2^1/_2$ und $4^1/_2$ Stunden nach der Insulingabe festgestellt. Untersucht wurden insgesamt 20 mit Insulin eingestellte Zuckerkranke verschiedener Stoffwechsellage, verschiedenen Schweregrades, Alters und Diabetestyps (Katsch[28], Mohnike[29]). Wir nahmen Diabetiker so unterschiedlicher Verhaltensweisen, um nicht bei einer festgelegten Kategorie Fehlschlüssen ausgesetzt zu sein.

Ergebnisse.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen sind auf der Tabelle 1 und der Abb. 1 als Einzelbeispiel (Patient Nr. 18) dargestellt.

a) Die Wirkung des Insulins auf den Blutzucker ist so geläufig, daß es sich erübrigt, näher darauf einzugehen. Auch in unseren Fällen wird eine Blutzuckersenkung nirgends vermißt, initiale Insulinhyperglykämie findet sich in einem Teil der Fälle (7, 9, 12, 15, 19). Bei einigen Patienten ist eine gegenregulatorische Hyperglykämie nach Blutzuckersenkung zu beobachten, die frühestens nach $3^1/_2$ (2, 14) und spätestens nach 5 Stunden (1, 3, 7, 8, 16, 20) auftrat und uns im Zusammenhang mit der auslösenden Adrenalinausschüttung interessiert.

b) Die Messung der Augendruckverhältnisse ergab ein Ansteigen des BD in allen Fällen außer 15 und 19 (bei einer Fehlergrenze von 1 mm Hg). Teilweise steigt der BD in erheblichem Umfange an (4, 5, 11, 12, 18). Dieser Anstieg erfolgt nicht immer kontinuierlich, sondern die Hauptzunahme des Augendrucks tritt $2^1/_2$ Stunden nach Insulingabe auf. Bei einem Patienten wurde ein Anstieg des BD erst nach $4^1/_2$ Stunden beobachtet (1). Es zeigte sich, daß die Werte des BD nach dem ersten Anstieg nach $2^1/_2$ Stunden teils weiter steigen (2, 8), teils nach $4^1/_2$ Stunden bereits wieder im Abnehmen begriffen sind (4, 14, 16, 20), im größten Teil der Fälle jedoch stationär bleiben (3, 5—7, 9—13, 17,

[27] Abel: J. Pharmacol. (Am.) **31**, 65 (1927). — [28] Katsch: Med. Klin. **1946**, H. 2/3. — [29] Mohnike:: Dtsch. Gesdh.wes. **1**, 393 (1946).

18). Bei verschiedenen Patienten hält also die Wirkung des Insulins auf den BD verschieden lange vor, jedoch scheint uns überall grundsätzlich der gleiche Wirkungsmodus vorzuliegen. Die verschieden hohen bzw. niedrigen Nüchternwerte des BD können weder mit dem Typ des Diabetes noch mit der Stoffwechsellage oder einer anderen Besonderheit des Falles in Beziehung gebracht werden. Ebenso erscheint die Stärke der Reaktion auf Insulinzufuhr ganz unschematisch und nicht an bestimmte Merkmale gebunden. Eine klare Parallelität des Verhaltens des BD und des Absinkens des Blutzuckers ließ sich nicht eruieren, und es erübrigt sich aus diesem Grunde, darauf einzugehen. Wir sehen uns in dieser Hinsicht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von E. Marx [22]. Auf eine abweichende Reaktionsform des BD auf Insulinzufuhr wird noch weiter unten eingegangen werden.

c) Im größten Teil der Fälle verkürzt sich die QRZ während der gesamten Beobachtungszeit ($4^1/_2$ Stunden) unter Insulinwirkung fortlaufend (1—3, 5—7, 10, 11, 15—18, 20), bei einer geringeren Zahl von Patienten bleibt nach der ersten Verkürzung eine weitere aus (4, 8, 12—14). Bei einzelnen Versuchen verkürzt sich die QRZ weiter, bei denen die Insulinwirkung — gemessen am Blutzuckerwert — bereits nachzulassen beginnt, oder aber bereits Gegenregulationen (Adrenalinausschüttung) in Gang gekommen sind. Man kann dies entweder auf die Trägheit der Reaktion zurückführen. Die letztere Annahme gegenregulatorischer Kräfte würde die Möglichkeit einer weiteren Verkürzung der QRZ durch Adrenalin in den Vordergrund rücken. Die Beschleunigung der QRZ durch Adrenalin ist eine oft festgestellte Tatsache (Gülzow [14], Zothe [25]). Wie schon beim BD, müssen wir auch bei der QRZ auf die von keinem besonderen Merkmal abhängigen Nüchternwerte hinweisen. Es ist dies dasselbe Phänomen individueller Verschiedenheit, wie es auch Gülzow [14] bei den Normalwerten der QRZ vor den Plasmaphareseödem-Versuchen an Hunden beobachtete. Wir haben keinen Anhalt, um für die Stärke der Reaktion der kutanen Lymphstromgeschwindigkeit auf Insulinzufuhr eine Regel aufstellen zu können. Daß die Verkürzung der QRZ bei niedrigen Ausgangswerten (4, 6, 12, 16) nicht erheblich sein kann, ergibt sich aus rein mathematischen Erwägungen. Eine direkte Parallelität zwischen Verkürzung der QRZ und Absinken des Blutzuckers ließ sich ebenfalls nicht eruieren, wohl aber besteht generell ein gleichsinniges Absinken beider Kurven (Abb. 1).

d) Zwischen den Werten des BD und der QRZ konnte ebenfalls keine direkte Beziehung im Sinne einer umgekehrten Proportionalität festgestellt werden, indem einerseits der BD stark ansteigt, die QRZ sich jedoch nur wenig verkürzt (4, 6, 8, 11, 12, 18), andererseits auch umgekehrte (1, 3, 17, 20) oder sich etwa entsprechende (2, 5, 7, 10, 13, 14, 16) Verhältnisse vorliegen.

Tabelle I.

Lfd. Nr.	Reg.-Nr.	Name Alter Geschl.	Insulineinstellung[1]	Diät BE[2]	Kh-Bilanz[3]	Alt-Insulin 7 Uhr	Untersuchung[4]	7⁰⁰	7³⁰	8⁰⁰	8³⁰	9⁰⁰	9³⁰	10⁰⁰	10³⁰	11⁰⁰	11³⁰	12⁰⁰
								Uhr										
1	8707/47	P. F. 50 J. ♂	16 10 Alt 18	25	+ 282	8 E Degewop	BZ BD QRZ	123 18 103	117	172	161	101	69 17 74	69	71	64	69 20 27	102
2	8719/47	E. Ü. 58 J. ♂	20 10 Alt 20	23	+ 273	8 E Degewop	BZ BD QRZ	108 16,5 55	94	121	101	57	52 20,5 23	41	57	64	50 24 18	61
3	8727/47	H. S. 20 J. ♂	20 10 Alt 20	23	+ 184	8 E Degewop	BZ BD QRZ	177 17 100	175	161	179	135	144 21 65	112	125	98	122 21 35	129
4	8716/47	H. W. N. 31 J. ♂	24 — Depot —	23	+ 186	8 E Degewop	BZ BD QRZ	226 11 32	209	233	195	168	125 20,5 26	123	95	82	94 19 26	87
5	8713/47	O. S. 35 J. ♂	34 — Depot 10	26	+ 288	8 E Lilly	BZ BD QRZ	186 12,5 83	168	170	175	137	135 23 63	112	103	100	100 22,5 40	101
6	8683/47	K. M. 38 J. ♂	26 14 Alt 22	32	+ 350	8 E Lilly	BZ BD QRZ	265 12 40	249	203	167	163	113 18 34	142	117	112	89 17,5 30	89
7	8699/47	L. P. 17 J. ♂	12 — Depot —	25	+ 267	8 E Lilly	BZ BD QRZ	82 15 63	87	71	44	42	37 22 42	40	46	51	42 21 30	66
8	8692/47	G. M. 35 J. ♂	14 10 Alt 14	25	+ 284	8 E Lilly	BZ BD QRZ	226 12 52	202	178	122	117	82 17,5 40	106	94	78	96 20 40	95
9	8688/47	M. V. 51 J. ♀	18 16 Alt 18	26	+ 260	8 E Degewop	BZ BD QRZ	91 11,5 35	109	115	85	91	86 18 33	69	61	82	63 17,5 48	50
10	8712/47	M. B. 38 J. ♀	30 — Depot 10	24	+ 204	8 E Degewop	BZ BD QRZ	135 15 115	126	147	110	126	107 23 70	82	75	81	96 23 60	73

11	8726/47	D. M.	16		26	+ 334	8 E	BZ	151	122	115	103	73	61	46	54	56	58	44
		12 J.	—	Depot			Degewop	BD	13					27				26	
		♂	8					QRZ	42					30				16	
12	8725/47	G. B.	10		24	+ 317	6 E	BZ	105	109	105	101	56	63	54	44	56	52	50
		12 J.	4	Alt			Degewop	BD	12					22,5				23	
		♂	6					QRZ	35					23				22	
13	8722/47	A. S.	38		26	+ 262	8 E	BZ	217	238	202	153	117	108	129	92	115	94	72
		40 J.	—	Depot			Degewop	BD	15					17,5				17,5	
		♂	14					QRZ	55					32				30	
14	8666/47	O. L.	22		23	+ 177	8 E	BZ	127	144	151	150	110	112	68	106	144	125	92
		45 J.	10	Alt			Degewop	BD	24,5					27				25	
		♂	22					QRZ	54					44				43	
15	8734/47	H. M.			23	—42	8 E	BZ	226	230	224	203	162	140	148	131	162	135	129
		41 J.	—				Degewop	BD	22					18,5				20	
		♂						QRZ	77					60				45	
16	8705/47	G. B.	18			+ 329	8 E	BZ	108	94	91	77	66	79	64	54	58	54	80
		29 J.	14	Alt	29		Degewop	BD	19					24				18,5	
		♀	18					QRZ	43					33				30	
17	8701/47	J. E.	2		26	+ 334	8 E	BZ	133	106	81	81	59	70	45	39	43	39	42
		39 J.	—	Alt			Degewop	BD	17,5					22				21,5	
		♀	2					QRZ	44					20				15	
18	8721/47	H. B.	20		25	+ 225	8 E	BZ	278	225	188	146	143	135	130	97	109	113	103
		38 J.	16	Alt			Degewop	BD	12					22				22	
		♂	20					QRZ	59					55				35	
19	8717/47	H. W.	12		20	+ 232	8 E	BZ	94	124	88	59	49	47	57	31	42	63	51
		53 J.	—	Depot			Degewop	BD	17					18				18	
		♂	—					QRZ	63					67				65	
20	8736/47	A. B.	16		24	+ 210	8 E	BZ	81	76	71	65	51	55	51	44	53	59	65
		62 J.	—	Alt			Degewop	BD	23					26				23	
		♂	16					QRZ	82					62				50	

[1] Insulineinstellung
[2] BE = Broteinheiten
[3] KH-Bilanz = Aufgenommene Kh — ausgeschiedener Zucker } am Tage vor Belastung.
[4] BZ = Blutzucker; BD = Bulbusdruck; QRZ = Quaddelresorptionszeit.

e) Aus dem bis jetzt Erörterten ergibt sich also, daß der Blutzucker sich in üblicher Weise bewegt, der BD ansteigt und die QRZ sich verkürzt, ohne daß eine direkte Abhängigkeit zwischen den einzelnen Werten zu bestehen scheint. Diese Verhältnisse sind in der Abb. 1 an einem paradigmatischen Fall dargestellt. Sie wurden in prinzipiell übereinstimmender Weise in 17 von 20 Beobachtungen gefunden.

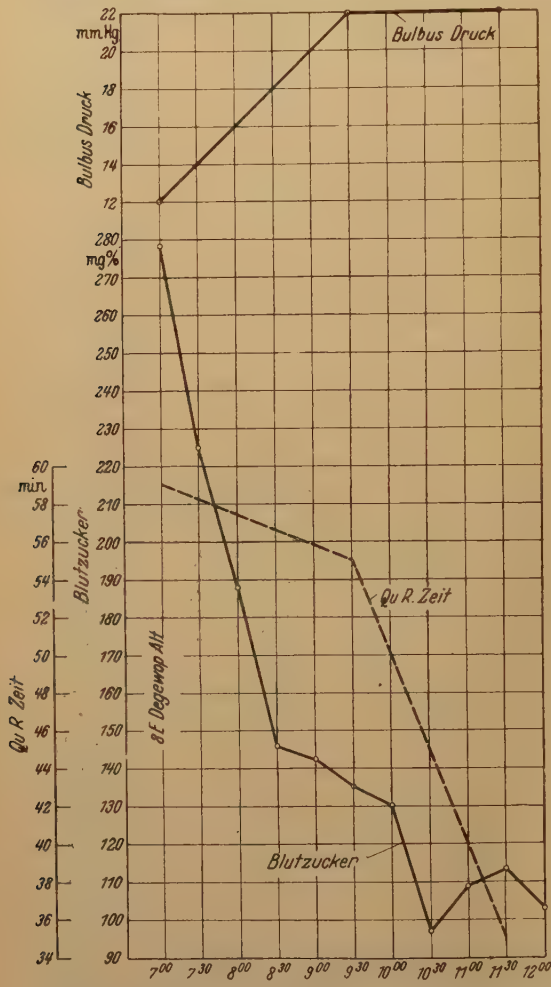


Abb. 1. Reg. Nr. 8721/47, H. B., 38 J., ♂. Beispiel der Reaktion des Bulbusdruckes und der Quaddelresorptionszeit auf 8 E Altinsulin im akuten Insulinbelastungsversuch (Näheres s. Text).

f) Jedoch sind noch 3 restliche Fälle zu erörtern, die sich diesem allgemeinen Schema nicht ohne weiteres einordnen lassen. Es sind dies die Patienten Nr. 9, 15 und 19.

Bei der Patientin M. V. (Nr. 9) stieg der BD in üblicher Weise an, die QRZ hingegen blieb zunächst nach $2^1/_2$ Stunden etwa gleich, und war nach weiteren 2 Stunden nicht nur nicht verkürzt, sondern erschien sogar in einer außerhalb der Fehlerbreite liegenden Weise über den Ausgangswert hinaus verlängert. Bei der Patientin bestand ein bei uns bereits mit Strophanthin behandelter dekompensierter Hypertonus mit Ödemen bzw. Ödemneigung. Es lag deswegen nahe, zu glauben, die QRZ sei bereits nüchtern so verkürzt (s. Zothe [25, 26], Gülzow [14]), daß eine weitere Verkürzung nicht mehr eintreten konnte. Womit jedoch eine Erklärung für die über den Nüchternwert hinausgehende Verlängerung sowie das gleichzeitig bestehende „normale" Verhalten des BD nicht gefunden ist.

Der zweite Fall betrifft einen Patienten (H. M., Nr. 15), der zu Hause auf 32 E Depotinsulin eingestellt war, jedoch wegen Insulinmangels seit 3 Tagen vor der Aufnahme nicht mehr gespritzt hatte. Sein Kh-Stoffwechsel war aus diesem Grunde erheblich dekompensiert, was in einer negativen Kh-Bilanz (— 42 g!) zum Ausdruck kam. Die 8 E Altinsulin bei der Belastung am Tage nach der Aufnahme waren das erste Insulin, das er bei uns erhielt. Es ist dies der einzige Fall mit einer ausgesprochenen Stoffwechseldekompensation, und man könnte vermuten, daß die nach unseren Erfahrungen geradezu paradoxe Reaktion des BD (Absinken auf Insulingabe) hiermit zusammenhängt. Da sich jedoch die QRZ gleichzeitig in üblicher Weise verkürzt, ist auch in diesem Falle keine sichere Erklärung gegeben.

Patient H. W. (Nr. 19) bietet wiederum ein anderes Bild. Bei ihm änderten sich weder der BD noch die QRZ bis $4^1/_2$ Stunden nach der Insulininjektion in einem außerhalb der Fehlerbreite liegenden Umfange. Es ist dies der einzige Fall, bei dem wir — außer der Wirkung auf den Blutzucker, welcher sich in üblicher Weise bewegte — keine Reaktion sahen. Wir möchten diese Tatsache auf das allgemeine Darniederliegen der Stoffwechselfunktionen zurückführen. Der Patient kam in stark abgemagertem Zustande mit Ödemen zu uns, die klinisch zum Teil auf Inanition, zum Teil auf eine von uns mit Strophanthin behandelte Myokardinsuffizienz zurückgeführt wurden. Ähnliches beobachtete Gülzow[14], wie bereits oben erwähnt.

Es gelingt uns also, *eine* Abweichung vom Verhalten des größten Teils der Diabetiker plausibel zu machen, für zwei weitere verschiedene Reaktionsformen kann eine Erklärung nicht gegeben werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Bei der Untersuchung des Einflusses einer einmaligen Insulininjektion im akuten Belastungsversuch auf Bulbusdruck und Quaddelresorptionszeit hat sich ergeben:

1. Deutsches und amerikanisches Insulin läßt einen grundsätzlichen Wirkungsunterschied nicht erkennen. Die niedrige Dosierung von 6 bzw. 8 E Altinsulin erscheint zum Erzielen einer Reaktion ausreichend.

2. Die Insulinwirkung auf den Blutzucker ist die übliche, es traten sowohl initiale Insulinhyperglykämien als auch gegenregulatorische Blutzuckersteigerungen auf.

3. Die Wirkung auf die Augendruckverhältnisse zeigte sich in einem Anstieg des BD. Die Nüchternwerte, die Stärke und der zeitliche Verlauf der Reaktion zeigten Verschiedenheiten, deren Genese auf individuellen, nicht näher bestimmbaren Faktoren beruht.

4. Die QRZ verkürzt sich unter Insulineinwirkung, wobei die Stärke der Reaktion zum Teil mit dem individuell verschiedenen Ausgangswert zusammenhängt. Die zeitliche Dauer der Verkürzung hält verschieden lange an. Eine Steuerung hierfür wird in der Adrenalinausschüttung in der Gegenregulationsphase vermutet.

5. Diese klaren Verhältnisse — Absinken des Blutzuckers, Erhöhung des BD, Verkürzung der QRZ — wurden in 17 von 20 Fällen gefunden. Abweichungen von der beschriebenen Reaktionsweise fanden sich in 3 Fällen, deren Verhalten erläutert wurde.

6. Eine direkte Parallelität zwischen Absinken des Blutzuckers einerseits, Erhöhung des BD und Verkürzung der QRZ andererseits wurde ebensowenig gefunden, als eine solche zwischen den Werten des BD und der QRZ. Beides sind charakteristische Reaktionsformen auf die hydropigene Kraft des Insulins, und die damit in Zusammenhang stehenden Wasserverschiebungen aus dem Blut in die Extrazellulärräume der Gewebe. Sie sind ganz allgemeine, mit nicht großer, individuell verschiedener Geschwindigkeit ablaufende Vorgänge. Ein Zusammenhang mit der Schwere des Diabetes oder sonstigen Verschiedenheiten der Patienten, wie Alter, Geschlecht usw., scheint nicht zu bestehen.

Aus dem Pharmakologisch-Pharmakognostischen Institut der früheren Deutschen Karls-Universität in Prag (Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky).

Diurese, Filtration und Sekretion der Niere unter dem Einfluß verschiedener Pharmaka.

I. Mitteilung.

Der Einfluß der intravenösen Infusion auf die Grunddiurese des Hundes.

Von

G. Kuschinsky und H. Langecker.

(Eingegangen am 12. August 1914.)

Es besteht eine weitgehende Übereinstimmung in der Auffassung, daß primär im Glomerulus ein Ultrafiltrat des Plasmas gebildet wird, das in den verschiedenen Abschnitten des Tubulusapparates durch Rückresorption (RR.) von Wasser und gelösten Bestandteilen in den endgültigen Harn verwandelt wird. Dazu kommen niereneigene Stoffwechselprodukte (z. B. Ammoniak). Eine Veränderung der Höhe der Diurese, soweit sie von der Niere selbst abhängig ist, kann durch Beeinflussung der Filtration bei gleichbleibender RR. oder durch Verminderung der RR. bei gleichbleibender Filtration zustande kommen. Die Wirkungsweise der Diuretika wird diesen beiden Möglichkeiten entsprechend ausgelegt; praktisch wird allerdings unter ihrem Einfluß fast immer eine verminderte RR. angenommen.

Für eine Reihe von Farbstoffen und Nierenkontrastmitteln ist als weitere Leistung der Niere eine Ausscheidung durch aktive Sekretion der Tubuluszellen nachgewiesen. Einen wesentlichen Beitrag für diese Auffassung lieferten Versuche an Tieren mit einem gesonderten Portalkreislauf des Tubulusapparates (Frosch) und Tieren ohne Glomerulus (aglomeruläre Fische). Beim Warmblüter ist das hohe Konzentrierungsvermögen bei niedrigem Plasmaspiegel für diese Stoffe charakteristisch. Daß eine derartige Sekretion von größeren Farbstoffmengen ohne gleichzeitige Ausscheidung von Wasser vor sich geht, ist schwer vorstellbar. Man müßte also in solchem Falle auch eine Wasserdiurese durch aktive Sekretion annehmen. Wenn ein derartiger Apparat mit einer großen Ausscheidungskapazität besteht, so wäre zu erwarten, daß er auch physiologischerweise bei bestimmten Belastungen bzw. durch pharmakologische Einflüsse in Tätigkeit tritt. Dabei ist zu bedenken, daß gerade die wegen ihrer Nachweisbarkeit in sehr niedrigen Konzentrationen als

Sekretionsprodukte erkannten Stoffe nur eine ganz einseitige Charakteristik des Sekrets darstellen. Demnach müßte man annehmen, daß an der Harnbereitung neben der Filtration und RR. auch eine Sekretion beteiligt sein kann.

Die bisherige Anschauung des Wirkungsmechanismus der Diuretika ist in mancher Beziehung nicht befriedigend, da sich eine Reihe von Widersprüchen ergibt [1]. Wir stellten uns daher die Aufgabe, gleichzeitig die Filtration, RR. und Sekretion zu bestimmen sowie ihre Beteiligung an pharmakologischen Wirkungen zu ermitteln.

Die günstigsten Bedingungen für die Filtratberechnungen nach Rehberg ergeben sich bei einer möglichst gleichbleibenden Plasmakonzentration der Testsubstanzen, die jedoch nur durch Dauerinfusion erreicht werden kann. Für dieses Vorgehen mußte die Einwirkung der Dauerinfusion als solche auf die Diurese ohne Belastung geprüft werden. Bei dieser Versuchsanordnung kann nur erfaßt werden, was sich zwischen Plasma und Harn abspielt, also was die Niere als Erfolgsorgan leistet. Im Folgenden wurden untersucht: 1. Grunddiurese ohne Belastung, 2. Diurese mit Kochsalzinfusion, 3. Diurese mit Kochsalz-Inulin-Infusion.

Methodik.

a) Experimentelle Methodik.

Zu den Versuchen wurden nicht narkotisierte weibliche, kolpotomierte Bastardhunde im Gewicht von 6—24 kg verwendet. Sie wurden 16 Stunden vor Versuchsbeginn gefüttert. Nach der Fütterung wurde das Trinkwasser entzogen. Wegen der Kriegsverhältnisse war es nicht möglich, Standardfutter zu geben, so daß Schwankungen in der Reaktionsbereitschaft nicht vermeidbar waren. Durch größere Versuchszahlen und jeweilige Vergleiche an denselben Tieren wurde versucht, diese Schwierigkeiten zu umgehen. Die Kochsalzzulagen von täglich 6 g je 10 kg Hund wurden konstant gehalten. Nach den Harnabnahmen durch Glaskatheter in Abständen von 20—30 Min. wurde die Blase zum genauen Harnabgrenzen zweimal mit je 30 ccm physiologischer Kochsalzlösung gespült, um vor allem auch unter Einwirkung von Giften des vegetativen Systems die Folgen von Störungen des Blasentonus auszuschalten. Für die Plasmagewinnung wurde in Ein-Stunden-Intervallen Jugularisblut in einem Zentrifugenglas, das für je 10 ccm Blut 40 mg Ammoniumoxalat in Substanz enthielt, aufgefangen und möglichst rasch mit 8000 Touren zentrifugiert. Zu Beginn des Versuches wurde nach Abgrenzen des Harns und Blutentnahme eine Lumbalpunktionsnadel in

[1] Smith, H. W.: The physiology of the kidney, New York 1937. — Leiter, L.: Ann. Rev. Physiol. 3, 509 (1941). — Pütter, A.: Die Dreidrüsentheorie der Harnbereitung. Berlin 1926. — Frey, E.: Klin. Wschr. 1937, 289.

einer Beinvene durch Gipsverband befestigt, mit Salzlösung blutfrei gespült (Gerinnung!) und über einen längeren Gummischlauch mit der Präzisionsspritze nach STRAUB[2] verbunden, so daß die Versuchstiere sich frei bewegen konnten. Mit einer Geschwindigkeit von meistens 0,7 ccm je Minute wurde die 0,6%ige Kochsalzlösung mit oder ohne Zusatz von Kreatinin bzw. Inulin infundiert. Verwendet wurde Kreatinin bzw. Kreatinin-HCl Merck, als Inulin in der ersten Zeit Inulin Merck, später ein aus Dahlienknollen hergestelltes Produkt, das in Anlehnung an die Methode von Co. TUI und Mitarbeitern[3] durch Filtration der kochenden Lösung über ein SCHOTTsches Glasbakterienfilter 25 G 5 auf 3 von den letzten Resten pflanzlichen Eiweißes gereinigt wurde. Die Lösungen waren in den verwendeten Konzentrationen ungiftig. Bei Hunden von 11—20 kg gelang es mit Konzentrationen von 1—2,5%iger Inulin- bzw. Kreatininlösung einen Plasmaspiegel von 10—35 mg-% zu erzielen. In den ersten 30 Min. wurden zur Auffüllung des Gefäßsystems die Testsubstanzen in einer um $^1/_3$ erhöhten Konzentration gegeben. In einem Teil der Versuche wurde Leitungswasser durch Magenschlauch nach einer Gabe von 200 ccm 2 Stunden vor Versuchsbeginn in einer Menge von 0,7—3 ccm je Minute zusätzlich verabreicht.

b) Berechnung der Resultate.

Die Harnmenge jeder Sammelperiode wurde aus der im Spülharn gefundenen Menge Kreatinin korrigiert: ccm Restharn = (mg-% Kreatinin im Spülharn × ccm Spülharn) : (100 × mg Kreatinin je ccm im Hauptharn). Bei schwieriger Harnentnahme, z. B. Störungen des Blasentonus kann der Restharn Werte bis zu 30—50% des Hauptharns betragen. Die Plasmawerte wurden in einer Kurve zu den Abnahmezeiten in Beziehung gebracht und jener Wert interpoliert, welcher der Halbzeit zwischen 2 Harnentnahmen entsprach. Die Clearance ist ein Produkt aus dem Verhältnis des Gehaltes der Testsubstanz während einer Sammelperiode im Harn zu dem Gehalt im Plasma der Halbzeit entsprechend und der Harnmenge je Minute, also $\frac{\text{mg-\% U.}}{\text{mg-\% P.}} \times$ ccm U. Nur bei den Filtrationstestsubstanzen ist Clearance = filtrierter Harnmenge. Da Harnabnahmen und analytisches Aufarbeiten trotz Doppelbestimmungen unvermeidbare Ablesefehler einschließen, wurde aus Werten zusammengehörender Versuchsperioden das Mittel genommen und nur größere Ausschläge als gesichert betrachtet. Chlorid und Natrium wurden zur Erleichterung von Vergleichen in Milli- bzw. Mikromol angegeben.

---

[2] STRAUB, W.: Arch. exper. Path. (D.) **185**, 457 (1937). — [3] TUI, Co., K. L. MCCLOSKEY, M. SCHRIFT and A. L. YATES: J. amer. med. Assoc. **109**, 250 (1937).

c) Chemische Methodik.

Die vorliegenden chemischen Methoden wurden in einigen Fällen der Versuchsanordnung angepaßt. Die Analysen wurden immer in Doppelbestimmungen von mindestens 2 ccm Analysenmaterial ausgeführt und nur übereinstimmende Werte verwendet.

Kreatininbestimmung: Die Bestimmung im Plasma und Harn geschah nach Folin und Wu[4]. Die Pikrinsäure wurde nach Benedict gereinigt[5]. Das Plasma wurde mit Cadmiumhydroxyd enteiweißt (Fujita und Iwatake [6]). Dabei wurde das Kreatinin entgegen zahlreichen Literaturangaben verlustlos wiedergefunden, wie auch Alving, Rubin und Miller[7] angeben. Die kolorimetrische Bestimmung geschah im Photozellenkolorimeter nach Havemann[8]. Durch von Zeit zu Zeit wiederholte Prüfungen der gleichen Farbfilter wurde die Konstanz der Leistung des Kolorimeters und der Lichtquelle festgestellt. Für alle kolorimetrischen Bestimmungen wurden mit den Reinsubstanzen Eichkurven hergestellt. Als Farbfilter diente für die Kreatininbestimmung das Schottsche Grünfilter VG 9 2 mm. Die Nullküvette wurde mit alkalischer Pikrinsäure in Verdünnung gefüllt, die den Versuchsbedingungen entsprachen. Bei der Bestimmung des endogenen Kreatinins im Spülharn zur Berechnung der Harnkorrektur wurde zur Erreichung größerer Farbenintensität entweder statt 1 ccm bis zu 20 ccm zur Analyse verwendet oder nach Art der Plasmabestimmung gearbeitet. Für die Bestimmung des endogenen Kreatinins im Plasma wurde soviel enteiweißtes Plasma benutzt, daß unter der Verwendung der Makro- bzw. Halbmikroküvette mit dem Durchmesser von 30 mm etwa im Bereich von 100 Trommelteilen abgelesen werden konnte. Bei der Verwendung der Halbmikroküvette wurde mit 4 ccm Plasmafiltrat gearbeitet. Als Filter diente BG 14 2 mm und BG 23 1 mm. Die zugrunde gelegten Eichkurven erwiesen sich in diesem Bereich als sehr verläßlich. Trotzdem wurden zur Sicherheit jeweils 3 Proben einer Standardlösung mituntersucht. Um zu entscheiden, wieweit Diffusion von Kreatinin aus den roten Blutkörperchen den Plasmawert für das endogene Kreatinin beeinflußt, wurde in einem Versuch das abgenommene Blut 5 Min. bei 11000 Umdrehungen zentrifugiert und die Abtrennung des Plasmas nach 10, 20, 30 und 40 Min. vorgenommen. Die so gewonnenen 4 Kreatininwerte stimmten völlig überein.

Chloridbestimmung: Chlorid wurde im Harn nach Volhard in der Modifikation Arnold-Salkowski[9] bestimmt. Im Plasma wurde die auf

[4] Folin, O. and H. Wu: J. biol. Chem. (Am.) **38**, 98 (1919). — [5] Benedict: J. biol. Chem. (Am.) **82**, 1 (1929). — [6] Fujita, A. u. D. Iwatake: Biochem. Z. **242**, 43 (1931). — [7] Alving, A. S., J. Rubin and B. F. Miller: J. biol. Chem. (Am.) **127**, 609 (1939). — [8] Havemann, R.: Biochem. Z. **301**, 105 (1939). — [9] Rona, P.: Praktikum der physiologischen Chemie, Springer 1929.

der Umsetzung von NaCl + $AgJO_3$ beruhende Methode von Haslewood und King[10] benützt. Zur Enteiweißung diente bei den Kreatininversuchen Cadmiumhydroxyd, da Zinkhydroxyd zu wesentlichen Verlusten an Kreatinin führt. Die dabei erhaltenen Plasmawerte liegen etwas niedriger als bei Verwendung der Zinkfällung (bis 3%). In späteren Versuchen wurde das Chlorid im Harn und Plasma mercurimetrisch bestimmt. Dafür wurde eine von Lang[11] für das Blut angegebene Methode für den Harn angepaßt[12].

Die Natriumbestimmungen wurden von Mra. Pharm. E. Werber durchgeführt. Natrium wurde im Plasma und Harn nach Dreguss[13] als Zinkuranylnatrium bestimmt. Im Harn wurde das Kalium mit Ammoniumperchlorat entfernt; dazu wurde der Harn mit Ammoniumperchlorat in Substanz versetzt (für 3—5 ccm 0,2 g), gut durchgeschüttelt, für 30 Min. auf Eis gestellt und filtriert. Das zur Gerinnungshemmung verwendete Ammoniumoxalat störte die Bestimmung nicht. Die Verdünnung bei der Enteiweißung bzw. die Menge der mit Zinkuranylacetat zu fällende Flüssigkeit wurde so gewählt, daß zur Titration 1,5—4 ccm n/10 Natronlauge verwendet werden konnte. Als Richtlinie diente der vorher im Harn ermittelte Chloridwert.

Versuchsergebnisse.

a) Diurese und Chloridausscheidung ohne Wasserbelastung (Grunddiurese).

Wird bei Hunden im Gewicht von 8—20 kg 15 Stunden nach der letzten Fütterung und Wassergabe die Ausscheidung von Wasser und Chlorid geprüft, so ergeben sich für Harnmenge und Chloridausscheidung verhältnismäßig niedrige Werte (s. Tabelle 1). Die Chloridausscheidung geht nicht immer der Harnausscheidung parallel.

Wenn die Hunde 36 Stunden vor der Beobachtungszeit das letzte Wasser und Futter bekamen, so waren die Diuresewerte noch niedriger. Sie betrugen bei etwa 20 kg Körpergewicht 0,2—0,5 ccm/Min. * Diese Werte weisen darauf hin, daß der Zustand der Wasserdepots maßgebend für die Höhe der Diurese ohne Belastung ist. Einige Versuche wurden über 9 Stunden ausgedehnt. Bei diesen Tieren wurden die Ergebnisse der 4-Stunden-Perioden bestätigt. In 3 derartigen Versuchen konnten wir das Abklingen einer verhältnismäßig höheren Diurese etwa 20 Stunden nach der letzten Wasser- und Futtergabe beobachten (vgl. Tabelle 2: Versuch 106, 109 und 110). Abgesehen von dem soeben erwähnten Abklingen der Wasserbelastung war die Diurese immer gleichmäßig, die

[10] Haslewood, G. A. D. and E. J. King: Biochem. J. (Brit.) **30**, 902 (1936). — [11] Lang, K.: Biochem. Z. **290**, 289 (1937). — [12] Die Methode erscheint in der Biochem. Zeitschrift. — [13] Dreguss, M.: Biochem. Z. **303**, 69 (1939).

* Diese aus 30 Einzelversuchen gewonnenen Werte entsprechen nur einer einstündigen Sammelperiode.

Tabelle 1. *Diurese an Hunden ohne Belastung (Grunddiurese). Durchschnittswerte aus 4-Stunden-Perioden.*

Hund	Ausscheidung je Minute		
	Harn/ccm	endogenes Kreatinin/mg	Chlorid/Mikromol
AH. 18 kg	0,3; 0,3; 0,6; 0,4 0,8; 0,5; 0,6; 0,3 1,0; 0,9; 0,5; 0,8 0,4; 0,7; 1,2; 0,6 0,5; 0,5; 0,7.	0,48; 0,43; 0,42; 0,42 0,48; 0,49; 0,39; 0,48 0,53; 0,5; 0,49; 0,51 0,47; 0,49; 0,41; 0,41 0,42; 0,44.	40; 28; 23; 25 108; 56; 55; 57 150; 114; 124; 64 64; 156; 106; 67 94; 24; 61.
Fo. 8,5 kg	0,2; 0,09; 0,4; 0,5 0,1; 0,4; 0,7; 0,3 0,4; 0,1; 0,09; 0,1 0,1; 0,2.	0,16; 0,15; 0,14; 0,14 0,14; 0,15; 0,16; 0,14 0,15; 0,15; 0,15; 0,16 0,16; 0,17.	11; 22; 19; 87 44; 41; 47; 11 11; 43; 2,1; 9,2 0,9; 11.
Crk. 7 kg*	0,05; 0,4; 0,04; 0,09 0,14; 0,3; 0,4; 0,2 0,3; 0,1.	0,13; 0,16; 0,16; 0,17 0,23; 0,19; 0,21; 0,22 0,17; 0,24.	3,5; 30; 3,7; 51 6,8; 2,7; 2,1; 22 4,4; 48.
Sy. 24 kg	0,7; 1,1; 0,5; 1,1 0,6; 0,4; 0,4; 0,6 0,9; 1,1; 0,4; 0,8 0,9; 0,4; 0,6; 0,3 0,8; 0,6; 1,1; 0,4 0,4; 0,6.	0,43; 0,63; 0,44; 0,47 0,4; 0,44; 0,44; 0,44 0,5; 0,59; 0,53; 0,48 0,47; 0,47; 0,45; 0,43 0,47; 0,44; 0,43; 0,41 0,28; 0,45.	23; — 28; 90 28; 102; 125; 26 86; 138; 20; 32 79; 84; 127; 77 87; 26; 32; 16 88; 187.
Aa. 10 kg	0,6; 0,3; 0,4; 0,5 0,3; 0,3; 0,4; 0,2	0,25; 0,24; 0,25; 0,24 0,27; 0,27; 0,22; 0,26	32; 39; 117; 15 104; 154; 22; 57

Die Hunde erhielten 15 Stunden vor Versuchsbeginn Futter und Wasser. — Die zugehörigen Werte stehen an den einander entsprechenden Stellen der Tabelle.

Kurve zeigte keine wellenförmigen Schwankungen. Die Chloridausscheidung fiel im Laufe dieser Versuche auch bei gleichbleibender Diurese langsam ab. Die Natriumausscheidung ist fast immer kleiner als die Chloridausscheidung.

Die Diuresewerte nach 36 Stunden Karenz sind die niedrigsten. Sie entsprechen einer „Grunddiurese". Auch die Werte der Tabelle 1 und die entsprechenden der Tabelle 2 liegen zum Teil noch im Bereich dieser Grunddiurese.

Bei größeren Wasserdepots oder Belastungen, z. B. mit Testsubstanzen erhöht sich der Wert. Wegen der Notwendigkeit derartiger Belastungen zur Bestimmung von Filtration und Sekretion ist eine genaue Kenntnis des Einflusses der Belastungen auf die Diurese erforderlich.

b) Diurese, Natrium- und Chloridausscheidung bei Infusion von 0,6%iger Kochsalzlösung.

Bei einer intravenösen Infusion von 0,7 ccm/Min. einer 0,6%igen Kochsalzlösung zeigte die Diuresekurve einen wellenförmigen Verlauf.

* Bei diesem Hunde schwankten die Diuresen in den einzelnen Perioden stark, offenbar psychisch bedingt.

In 3 von 5 Versuchen war je eine Welle in der ersten und in der zweiten Versuchshälfte zu beobachten. In einem Falle war nur die erste Welle vorhanden, in einem anderen Falle erstreckte sich eine Welle über die ganze Versuchsdauer. Das Ausmaß der Diuresesteigerung war zum Teil beträchtlich. Die Harnausscheidung stieg auf das Doppelte bis 15fache des Ausgangswertes (s. Tabelle 2). Natrium und Chlorid machen diese Schwankungen mit, wenn auch nicht immer in dem entsprechenden Ausmaße. Die Höhe der Ausgangswerte für Wasser und Kochsalz ist nicht entscheidend für das Ausmaß der Welle. Die Natriumausscheidung ist in den ersten Stunden wie in den Grunddiureseversuchen kleiner als die Chloridausscheidung, später aber wird mehr Natrium als Chlorid ausgeschieden. Dann zeigt der anfangs saure Harn meist alkalische Reaktion.

c) Diurese, Natrium- und Chloridausscheidung bei Infusion von Kochsalz-Inulin-Lösung.

In einer weiteren Serie von 5 Versuchen wurde unter denselben Versuchsbedingungen 1,2—2,4% Inulin mit der Kochsalzlösung infundiert. Die Ergebnisse waren im wesentlichen dieselben wie ohne Inulinzusatz. In 3 Fällen waren 2 Wellen zu beobachten, im 4. Falle nur anfangs eine große Welle, im 5. Falle war die 1. Welle gleichfalls zu beobachten, der Versuch wurde nach der 1. Versuchshälfte aus technischen Gründen abgebrochen. Auch Natrium und Chlorid verhielten sich wie nach Kochsalzinfusion allein.

d) Diurese mit intravenöser Dauerinfusion und Wasserbelastung per os.

In einigen Versuchen haben wir neben der intravenösen Infusion der Testsubstanzen auch orale Wasserbelastungen durchgeführt. Da die einmalige Wassergabe einen wellenförmigen Verlauf der Diuresekurve erzeugte, gingen wir dazu über, durch eine im Magen liegende Duodenalsonde kontinuierlich etwa 0,7—3, meistens 2 ccm Wasser je Minute zuzuführen nach einer Gabe von 200 ccm Wasser 2 Stunden vor Versuchsbeginn. Trotz der in dieser Zeit eingehaltenen kochsalzarmen Ernährung erzielten wir ausgiebige Diuresen von meistens 2—4 ccm je Minute, Mengen, welche durch intravenöse Zufuhr gleicher Flüssigkeitsmengen nicht erreicht werden. In 2 Versuchen haben wir noch einmal an demselben Tier und Versuchstag diesen Versuch durchgeführt. Es wurden intravenös bzw. per os 1,5 ccm destilliertes Wasser je Minute infundiert. Die Diurese war nach oraler Zufuhr mit 3,6 ccm je Minute 5mal größer als nach intravenöser Infusion, nach 3 ccm je Minute Leitungswasser per os bzw. 0,83%iger NaCl-Lösung intravenös war die Diurese 2 bzw. 0,4 ccm. Nach 1,5 ccm je Minute 1,2%ige NaCl-Lösung per os und intravenös war mit 1,4 bzw. 1,2 ccm je Minute kein wesentlicher Unterschied in der Diurese zu beobachten. Die Chloridausscheidung war in den

Tabelle 2. *Diurese an Hunden unter verschiedenen Belastungen. Höchste und niedrigste, innerhalb 9 Stunden beobachtete Werte, Mittelwerte in Klammern.*

Vers.-Nr.	Hund	Belastung	Diureseverlauf	Ausscheidung je Minute			Natrium-Chlorid-Differenz
				Harn ccm	Cl Mikromol = 0,001 Millimol	Na Mikromol = 0,001 Millimol	
100	schw. H. 18 kg	G[1]	gleichmäßig	0,14—0,25 (0,18)	7—46 (19)	8—26 (17)	—
107		G	anfänglich eine hohe Periode	0,15—0,88 (0,29)	10—26 (17)	8—18 (13)	—
103		NaCl[2]	2 W. *	0,11—0,55 (0,37)	9—57 (23)	8—35 (16)	—
				0,24—0,5 (0,33)	11—44 (22)	30—79 (46)	+
112		NaCl	1 W.	0,19—3,2 (1,3)	19—150 (72)	7—205 (97)	6 Perioden neg. dann pos.
116		I[3]	2 W.	0,19—0,66 (0,46)	27—127 (81)	26—84 (55)	—
				0,28—0,49 (0,39)	27—52 (42)	48—136 (98)	+
102	St. 18 kg	G	gleichmäßig	0,15—0,29 (0,22)	16— 59 (36)	9—32 (20)	—
106		G	von hoher Ausgangsdiurese abfallend	0,2 —1,0 (0,43)	20—117 (63)	15—75 (40)	—
109		G	von hoher Ausgangsdiurese abfallend	0,13—1,1 (0,44)	14— 82 (44)	14—93 (50)	+
104		NaCl	2 W.	0,2 —1,2 (0,72)	36—208 (45)	20—189 (38)	—
				0,43—1,6 (0,96)	14—206 (95)	24—227 (127)	+
114**		I	W.	0,22—0,78 (0,58)	27—130 (67)	16—145 (69)	—
101	w. H. 15 kg	G	gleichbleibende Diurese	0,16—0,3 (0,22)	11— 45 (28)	7—36 (16)	—
110		G	von hoher Ausgangsdiurese abfallend	0,29—2,2 (0,63)	38—107 (65)	28—78 (51)	—
105		NaCl	W.	0,26—0,87 (0,5)	9—127 (59)	6—109 (49)	—
			nachmittags gleichmäßig	0,22—0,37 (0,32)	7— 32 (24)	15— 85 (52)	+
115		I	2 W.	0,2 —1,28 (0,56)	4—131 (48)	6—122 (44)	— +
				0,17—0,46 (0,38)	3— 31 (15)	13— 90 (65)	+

120		G	gleichmäßig	0,17—0,27 (0,2)	55— 96 (73)	17— 72 (43)	—	
113		NaCl	2 W.	0,18—1,3 (0,8)	17—232 (125)	11—188 (98)	—	
	Li.			0,38—0,8 (0,53)	9— 47 (21)	15—137 (77)	+	
108	14,5 kg	I	2 W.	0,24—1,9 (0,95)	8—290 (130)	8— 47 (125)	+	+
				0,18—0,49 (0,32)	0,4— 8 (3,1)	8— 73 (37)	+	+
111		I	2 W.	0,35—1,9 (1,16)	11—207 (126)	20—208 (129)	—	+
				0,36—1,6 (0,76)	6— 38 (22)	12—137 (99)	+	

[1] Grunddiurese = ohne Belastung. — [2] NaCl = 0,6%ige NaCl-Infusion 0,7 ccm/Min. — [3] I = 1,5—2% Inulin in 0,6%iger NaCl-Infusion 0,7 ccm/Min. — * W. = Welle, 2 W. = 2 Wellen, in diesen Fällen ist jede Welle gesondert angegeben. — ** Der Versuch konnte aus technischen Gründen nur 6 Stunden durchgeführt werden.

genannten Fällen jeweils nach oraler Gabe nur etwa um 60% höher als nach intravenöser Zufuhr. Durch Steigerung der Geschwindigkeit der intravenösen Infusion bis auf 3,6 ccm 0,8%ige Kochsalzlösung je Minute war es nicht möglich, die Diuresehöhe nach Gaben von Wasser per os zu erreichen.

Das Ausmaß der Diurese nach Wasser per os hängt ab von den Chloriddepots im Gewebe; denn bei 2 Hunden mit besonders hoher Chloridkonzentration im Harn (35 Millimol-%) ließ sich in 3 Versuchen keine oder fast keine Diuresezunahme nach oraler Wasserbelastung beobachten, während bei denselben Tieren der gleiche Wasserstoß bei niedriger Chloridkonzentration im Harn die bekannte Wirkung hatte.

Wurden übrigens bei demselben Tier hintereinander intravenöse Infusionen von destilliertem Wasser, 12 Millimol-% Kochsalz (wenig hypotonisch) und 24 Millimol-% gegeben, so war die Diurese, Natrium- und Chloridausscheidung bei 12 Millimol-% am besten, bei 24 Millimol-% am schlechtesten. Die Minutenwerte waren im Durchschnitt für destilliertes Wasser: 0,95 ccm Harn, Natrium und Chlorid je 0,05 Millimol; für 12 Millimol Kochsalz: 1,6 ccm Harn, 0,17 Millimol Natrium und 0,12 Millimol Chlorid; für 24 Millimol-% Kochsalz: 0,7 ccm Harn, 0,1 Millimol Natrium und 0,06 Millimol Chlorid.

e) Diurese, Natrium- und Chloridausscheidung nach oraler Wasserbelastung bzw. bei Infusion von Kochsalz-Inulin-Lösung unter dem Einfluß von Atropin.

Atropin hemmt die durch die oben beschriebenen Belastungen hervorgerufene Wasser-, Natrium- und Chloridausscheidung. Über die Versuchsergebnisse wird in einer gesonderten Arbeit berichtet.

Besprechung der Ergebnisse.

Die Versuche haben wieder bestätigt, daß die Harnausscheidung bei Wasser- und Nahrungsentzug nicht unter einen bestimmten Grenzwert sinkt. Da unter den Bedingungen dieser „Grunddiurese" Filtrations- und Sekretionsbestimmungen nicht möglich sind, war es nötig, den Einfluß von Belastungen auf die Diurese zu prüfen. Dabei ergab sich, daß schon eine Kochsalzinfusion eine zum Teil beträchtliche Steigerung der Wasser-, Natrium- und Chloridausscheidung bewirkte. Die Diuresekurve zeigte keinen gleichmäßigen, sondern einen wellenförmigen Verlauf. Inulin ändert an diesem Versuchsergebnis nichts. Da die übrigen Bedingungen bei den verschiedenen Versuchen somit gleichgeblieben waren, so müssen wir die Änderungen der Diurese auf den Infusionsreiz allein beziehen. Nach den herrschenden Anschauungen könnte eine Diuresesteigerung bis auf das 15fache nicht durch eine Erhöhung der Filtration zustande kommen. Demnach käme nur eine Verminderung der Rückresorption im Tubulus in Frage. Die Hemmung der Diuresesteigerung durch Atropin könnte an sich auf eine vermehrte Rückresorption zu beziehen sein, oder es bestünde die Möglichkeit, daß Atropin als eine sekretionshemmende Substanz auch eine durch die Infusion hervorgerufene Sekretion unterdrückt hat. Auf diese Frage und auch auf das analoge Verhalten des Atropins beim Wasserstoß per os wird in einer besonderen Arbeit eingegangen. Daß Atropin nicht etwa über eine gefäßkontrahierende und dadurch filtratvermindernde Wirkung zu einer Diuresehemmung führt, geht daraus hervor, daß die Inulinclearance, wie in einer weiteren Arbeit gezeigt wird, nicht oder nur wenig beeinflußt wird.

Daß auf den Infusionsreiz ein rhythmischer Diureseverlauf einsetzt, entspricht offenbar einer Eigentümlichkeit der Nierenfunktion, vielleicht weil diese normalerweise nur Stoßbelastungen ausgesetzt ist. Das Auftreten von kurzfristigen Rhythmen ist für die Niere selbst (Glomeruli) bereits beschrieben worden. Die von uns beobachteten langfristigeren Rhythmen finden eine Parallele in den Rhythmen anderer Organfunktionen vor allem der Leber. Daß bei den Versuchen ohne Infusion keine Wellen beobachtet wurden, läßt erkennen, daß nicht die Auslösung eines bedingten Reflexes, z. B. durch die Tageszeit der Fütterung oder durch die Manipulationen der Harn- und Blutentnahme für das Entstehen der Diuresewellen maßgebend sein kann. Es ergibt sich demnach, daß für die Prüfung der Diuretika Versuche mit Infusion nicht brauchbar sind. Die vorliegenden Versuche lassen nicht entscheiden, ob unter dem Infusionsreiz eine „Salzdiurese" entsteht, wie sie nach Infusion von Natriumsulfat bekannt ist. Für eine Salzdiurese sprechen die oben angegebenen Werte der Wasserausscheidung nach Infusion von destilliertem Wasser, hypo- und hypertonischer Kochsalzlösung. In einem gewissen Konzen-

trationsbereich ist Kochsalzlösung per os nicht schwächer diuretisch als intravenös. Wasser per os ist stärker wirksam als Wasser oder Kochsalzlösung intravenös.

Zusammenfassung.

1. An weiblichen nicht narkotisierten Hunden wurde die Ausscheidung von Wasser, Natrium, Chlorid und endogenem Kreatinin unter den Bedingungen einer Grunddiurese bei Hunger und Durst untersucht. Die nötigen analytischen Methoden wurden zum Teil der Versuchsanordnung angepaßt.

2. Die Wasser-, Natrium- und Chloridausscheidung während der Grunddiurese wurde mit der Ausscheidung während einer zusätzlichen Infusion von Kochsalz- bzw. Kochsalz-Inulin-Lösung verglichen.

3. Die Harnausscheidung stieg unter dem Infusionsreiz auf das Doppelte bis 15fache. Die Ausscheidungskurve zeigte einen wellenförmigen Verlauf. Natrium-, Chlorid- und Wasserausscheidung verliefen gleichsinnig.

4. Wasser per os ist stärker diuretisch als Wasser oder Kochsalzlösung intravenös.

5. Atropin hemmt die unter dem Infusionsreiz erhöhte Wasser-, Natrium- und Chloridausscheidung.

Aus dem Pharmakologisch-Pharmakognostischen Institut der früheren Deutschen Karls-Universität in Prag (Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky).

Diurese, Filtration und Sekretion der Niere unter dem Einfluß verschiedener Pharmaka.

II. Mitteilung.

Die Filtration der Niere des Hundes unter verschiedenen Belastungen.

Von

G. Kuschinsky und H. Langecker.

(*Eingegangen am 12. August 1944.*)

Während in der vorigen Arbeit[1] die Einflüsse einer intravenösen Dauerinfusion von Kochsalzlösung auf die Ausscheidung von Wasser, Natrium und Chlorid gezeigt wurden, wird in der vorliegenden das Verhalten der Filtration unter denselben Bedingungen geprüft.

Eine wichtige Größe stellt das Filtrat während der Grunddiurese dar. Dazu wäre als Filtrationstest eine endogene Testsubstanz erforderlich. Als solche käme aus methodischen Gründen bisher nur das Kreatinin in Betracht. Beim Menschen wurde endogenes Kreatinin als Testsubstanz von Gukelberger[2] mit Inulin verglichen, der keine klare Gesetzmäßigkeit in der Reaktion zwischen Kreatinin- und Inulin-Clearance fand. Miller und Dubos[3] beobachteten beim normalen Menschen mit der enzymatischen Kreatininbestimmung, daß das wahre Kreatinin im Plasma 80—100%, im Harn fast 100% des mit der Jaffeschen Reaktion bestimmten entspricht. Beim Hund fanden dagegen Shannon und Mitarbeiter[4] in älteren Versuchen durch Adsorption an Lloyd-Reagenz in Plasma und Harn immer Nicht-Kreatinin. Goudsmit[5] wiederum nahm an, daß das Harnkreatinin des Hundes aus der chromogenen Substanz des Blutes stammt, also die beiden Substanzen identisch wären. Ein Vergleich der Inulin-Clearance mit der Clearance unter Benützung des endogenen Kreatinins beim Hund liegt nicht vor. Deshalb haben wir im folgenden bei der Grunddiurese und während einer Kochsalz-Infusion Filtratbestimmungen unter Zugrundelegung des endogenen Kreatinins durchgeführt, ferner während einer Kochsalz-Inulin-Infusion gleichzeitig die Clearance von Inulin und endogenen Kreatinin bestimmt.

---

[1] Kuschinsky, G. u. H. Langecker: Arch. exper. Path. (D.) **204**, 699 (1947). — [2] Gukelberger, M.: Dtsch. Arch, klin. Med. **189**, 496 (1942). — [3] Miller, B. F. and R. Dubos: J. biol. Chem. (Am.) **121**, 457 (1937). — [4] Shannon, J. A., N. Jolliffe and H. W. Smith: J. amer. Physiol. **102**, 534 (1932). — [5] Goudsmit, A. jr.: J. biol. Chem. (Am.) **115**, 613 (1936).

Methodik.

Die Methodik wurde zum Teil in der vorigen Arbeit[1] mitgeteilt.

Inulinbestimmung: Die Bestimmung wurde nach STEINITZ[6] durchgeführt. Harn und Plasma wurden mit $Zn(OH)_2$ nach SOMOGYI[7] gefällt. Die Zinksulfatlösung muß sehr sorgfältig hergestellt werden, da kleine Abweichungen große Verluste mit sich bringen, 50 ccm Zinksulfatlösung mit 0,75/n Natronlauge gegen Phenolphthalein als Indicator titriert, müssen 6,7—6,8 ccm Lauge verbrauchen. In Versuchen, in denen gleichzeitig Kreatinin bestimmt werden sollte, wurde mit Cadmiumhydroxyd nach FUJITA und IWATAKE[8] enteiweißt. Die dabei benützte Lauge war jedoch nur 1/n, da 1,1/n-Lauge bereits einen Verlust an Inulin im Plasma hervorruft. Für die Kreatininbestimmung wurde das so erhaltene Filtrat nochmals mit Lauge bis zur völligen Ausfällung des Cadmiumsulfats versetzt. (Auf 40 ccm Filtrat wurden 3 Tropfen einer 8/n-Lauge gegeben und nochmals filtriert.) In diesem Filtrat erzeugt die alkalische Pikrinsäurelösung keine Trübungen. Das eiweißfreie Filtrat wurde auch für die mercurimetrische Chloridbestimmung benützt. Das Resorcin-HCl-Gemisch wurde für jeden Versuch frisch hergestellt. Für die Farbreaktion wurde in ein 25-ccm-Meßkölbchen 5ccm der Lösung gegeben und bis zur Marke Resorcinsalzsäuregemisch aufgefüllt. Nach gründlichem Mischen wurde der Kölbcheninhalt in Glasröhren von 30 cm Länge und 2 cm Durchmesser gefüllt mit einem Trichter zugedeckt, 8 Minuten in einem Wasserbad bei 80° C gehalten und dann in fließendem Wasser gekühlt. Das Ablesen der Farbwerte wurde gleich angeschlossen und die Küvette dabei zum Schutz der Selenzelle gegen HCl-Dämpfe mit einem gut schließenden Gummistopfen verschlossen. Trotz Einhaltens genauester Arbeitsbedingungen konnten an den einzelnen Versuchstagen immer wieder geringe Verschiebungen der Eichkurve bei gleichbleibender Neigung festgestellt werden. Es wurden daher bei jedem Versuch eine Serie von Kontrollwerten gleichzeitig ermittelt, um die Lage der Werte zur Kurve festzustellen und einen Korrekturfaktor zu berechnen. Da es in den Versuchen nicht so sehr auf absolute Werte, sondern vor allem auf das Verhältnis Plasma- : Harninulin ankommt, wurden alle Werte für Blut und Harn mit demselben Reagensgemisch angesetzt und zur gleichen Zeit gekocht. Die Harne wurden bis zu einer dem Plasmainulingehalt entsprechenden Konzentration verdünnt, so daß alle Farbwerte im gleichen Maßbereich lagen. Falls die Harnverdünnungen im ersten Versuch nicht richtig getroffen wurden, wurden alle Plasma- und Harnwerte wiederholt. Für die Plasmabestimmung wurde der Leerwert in Abzug gebracht. Da die Harne wenigstens 500fach verdünnt werden müssen, ist unter diesen

[6] STEINITZ, K.: J. biol. Chem. (Am.) **126**, 589 (1938). — [7] SOMOGYI, M.: J. biol. Chem. (Am.) **86**, 655 (1930). — [8] FUJITA, A. u. D. IWATAKE: Biochem. Z. **242**, 43 (1931).

Tabelle 1. *Ausscheidung und Clearance des*

Versuch	Kreatinin bzw. Inulin		
	im Plasma mg-%	im Harn mg-/Min.	Clearance ccm
100 Kr.	1,21—1,31	0,24—0,4 (0,36)	18—33 (28)
107 Kr.	0,8—1,1	0,32—0,52 (0,43)	34—49 (43)
103 Kr.	1,43	0,4—0,53 (0,49)	32—37 (36)
Kr.	1,25	0,52—0,64 (0,53)	42—51 (42)
112 Kr.	1,7—2,1	0,44—0,67 (0,57)	22—36 (30)
116 Kr.	0,83—1,05	0,49—0,6 (0,53)	53—58 (55)
Kr.	1,08—1,15	0,57—0,77 (0,68)	51—72 (61)
In.	16,2—22,6	7,47—9,82 (8,59)	38—52 (45)
In.	14,2—15,6	8,28—9,74 (8,79)	54—63 (59)
102 Kr.	1,25—1,3	0,39—0,43 (0,42)	30—34 (32)
109 Kr.	1,48—2,54	0,27—0,52 (0,44)	15,8—28,6 (23)
104 Kr.	1,1—1,2	0,23—0,52 (0,45)	21—46 (39)
Kr.	1,1	0,43—0,57 (0,49)	38—50 (45)
114 Kr.	1,2—1,54	0,18—0,43 (0,41)	14,6—29 (24)
In.	10,0—12,3	2,78—8,24 (6,56)	48—59 (54)

Das Zahlenmaterial entstammt den in Tabelle 2 der vorigen Arbeit

Umständen der Leerwert zu vernachlässigen. Bei inulinarmem Harn muß dieser zur Erniedrigung des Leerwertes mit Kohle gereinigt werden. Entgegen der Angaben von Steinitz[6] ist die Kohlereinigung nur dann ohne Inulinverlust möglich, wenn vor der Adsorption das Inulin durch Fructose hydrolysiert wird (z. B. 5 ccm Zinkfiltrat wird mit 5 ccm 0,2 n Salzsäure in einem 50 ccm Meßkolben 15 Min. im kochenden Wasserbad erhitzt, nach Abkühlen mit 0,1 n Salzsäure auf 50 ccm aufgefüllt und hernach nach den Angaben von Steinitz mit Kohle behandelt). Die Kolometrie geschah mit dem Filter OG1 2 mm, das bis zu 2 mg-% Phenolrot nicht durchläßt. Bei den verwendeten Harnverdünnungen lag der Farbwert stets unter 2 mg-% Phenolrot. In späteren Versuchen haben wir die Methode von Alving und Mitarbeiter[9] angewendet. Da die entsprechenden Druckgefäße nicht beschaffbar waren, wurde unter Verzicht auf das Erreichen maximaler Farbintensität im offenen Gefäß gearbeitet. 2 ccm Plasma- bzw. Harn-Zinkfiltrat wurde mit 10 ccm Diphenylaminreagens versetzt und bei 95° C 30 Min. lang unter Zusatz von Bimssteinchen gekocht, nachher gekühlt und mit Alkohol auf 25 ccm aufgefüllt und gegen das Rotfilter RG 1 1 mm kolorimetriert. Auch hier wurden alle Plasma- und Harnproben auf etwa gleiche Inulinkonzentration verdünnt und zusammen mit 3 Proben einer Standardlösung von

endogenen Kreatinins und Inulins.

Versuch	Kreatinin bzw. Inulin		
	im Plasma mg-%	im Harn mg-/Min.	Clearance ccm
101 Kr.	1,06	0,32—0,36 (0,34)	30—34 (32)
110 Kr.	1,14—2,06	0,3—0,5 (0,34)	15—32 (28)
105 Kr.	1,28—1,36	0,31—0,43 (0,38)	23—31 (28)
Kr.	1,33	0,31—0,48 (0,38)	24—36 (28)
115 Kr.	1,3—1,38	0,23—0,29 (0,25)	18—22 (19)
Kr.	1,6—2,1	0,2—0,32 (0,29)	13—19 (16)
In.	9—11	4,79—6,69 (6,23)	54—74 (66)
In.	11	5,11—8,55 (6,85)	47—77 (61)
120 Kr.	1,5—1,66	0,36—0,44 (0,39)	23—29 (25)
113 Kr.	1,2—1,5	0,32—0,44 (0,37)	20—34 (26)
Kr.	1,5—1,8	0,31—0,41 (0,37)	17,6—26 (23)
108 Kr.	0,9—2,2	0,29—0,41 (0,35)	16,1—35 (32)
Kr.	0,9—1,1	0,21—0,4 (0,34)	23—43 (34)
In.	18	8,03—11,03 (9,5)	44—61 (53)
In.	13,7—18,8	5,75—12,51 (9,37)	51—67 (58)
111 Kr.	1,4	0,23—0,4 (0,37)	16—28 (25)
Kr.	1,6—2,0	0,3—0,4 (0,36)	14—25 (21)
In.	14,6	9,02—11,2 (9,86)	63—76 (67)
In.	11,0—16,6	7,74—10,66 (9,77)	59—76 (67)

angeführten Versuchen. Die Zahlen in Klammern bedeuten Mittelwerte.

0,75, 1,0 und 1,5 mg-% Inulin gekocht. Phenolrot in Konzentrationen von 0,1 bzw. 0,2 mg-% im Zinkfiltrat, das ist 1—2 mg-% im Plasma, stört die Reaktion nicht. Die Methode ist wegen der Steilheit der Kurve der Resorcinmethode vorzuziehen und ist auch unter Verwendung von mit Benzol denaturiertem 96%igen Alkohol ausführbar.

Versuchsergebnisse.

Clearance des endogenen Kreatinins (Tabelle 1).

Die Plasmawerte für endogenes Kreatinin lagen ungefähr bei 1 mg-%. Sie zeigten während eines Versuches Schwankungen zum Teil über das Doppelte. Die Kreatininausscheidung im Harn schwankte auch unter verschiedenen Belastungen bei den einzelnen Hunden wenig, verhielt sich also ähnlich wie unter den Bedingungen der Grunddiurese (s. Tabelle 1 der vorigen Arbeit). Durch die Schwankungen des Kreatinins im Plasma ergab sich jeweils für einen hohen Plasmawert eine niedrige Clearance und umgekehrt.

In 5 Versuchen wurde die Clearance des endogenen Kreatinins und des Inulins verglichen. In 4 von ihnen lag die Inulin-Clearance mit dem

[9] Alving, S., J. Rubin u. B. F. Miller: Klin. Med. (russ.) **27**, 115 (1941). — J. biol. Chem. (Am.) **127**, 609 (1939).

2—5fachen Wert wesentlich höher und in einem Versuch waren sie nahezu gleich.

Clearance bei Belastung mit Kreatinin und Inulin.

Nach den Untersuchungen von Shannon[10] und Richards, Westfall und Bott[11] werden beim Hund Kreatinin und Inulin nur filtriert und nicht zurückresorbiert, so daß beide Substanzen in gleicher Weise für die Filtratbestimmung geeignet sind. Wir konnten die Ergebnisse der genannten Autoren bestätigen (s. Tabelle 2).

Tabelle 2. *Kreatinin- bzw. Inulin-Infusion an verschiedenen Versuchstagen. Mittelwerte aus 3—7 Sammelperioden.*

Hund	Kreatinin	Inulin
s. H.	57;	60; 53; 69; 56; 52
Wo	78; 82	71; 77; 73; 90; 89; 64
A	46; 41; 41; 36; 38; 40	50; 47

Die Clearancebestimmungen mit den beiden Testsubstanzen stimmen gut überein. Deshalb haben wir in den folgenden Versuchen teils Inulin teils Kreatinin als Testsubstanz benutzt. Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, sind die Schwankungen der Clearance während des Versuches wesentlich geringer als die Schwankungen der Diurese. Die höchsten Werte betragen nicht einmal das Doppelte der niedrigsten, während die Diuresezunahmen unter Umständen den 15fachen Wert erreichen. Die Clearance an verschiedenen Versuchstagen ist bei demselben Tier auffallend gleichmäßig bis auf einige Ausnahmen. bei denen aber auch wieder die höchsten Werte nicht einmal das Doppelte der niedrigsten erreichen. Der einzelne Hund hält offenbar an einer ziemlich gleichbleibenden Filtration fest. Die Schwankungen sind vielleicht eine Folge der rhythmischen Glomerulustätigkeit. Nach diesen Befunden erscheint es unwahrscheinlich, daß die Filtration an extremen Diureseschwankungen mitbeteiligt ist. Um diese auch für die Prüfung von Diuretika wichtige Frage weiter zu klären, haben wir Mittel- und Extremwerte für Harnausscheidung und Clearance in einer Reihe geeigneter Versuche verglichen (s. Tabelle 4). Es zeigt sich, daß die den Extremwerten für die Harnausscheidung entsprechende Clearance nur ausnahmsweise vom Mittelwert stärker abweicht. Die Diureseschwankungen können also nicht durch Zunahme der Filtration bedingt sein.

Bei einem Vergleich von Wasser bzw. Kochsalzlösung per os oder intravenös an demselben Tier ergab sich folgendes: Nach 1,5 ccm destilliertem Wasser per os/Min. betrug das Filtrat 49 ccm, nach der-

[10] Shannon, J. A.: J. amer. Physiol. **112**, 405 (1935). — [11] Richards, A. N., B. B. Westfall and F. A. Bott: J. biol. Chem. (Am.) **116**, 749 (1936).

Tabelle 3. *Inulin-Clearance einzelner Hunde an verschiedenen Versuchstagen bei verschiedenen Belastungen.*

Hund	Schwankungen der Clearance-Werte in ccm. In Klammern Mittelwerte aus 3—12 Sammelperioden.			
b. Wi. 18 kg	23 — — 49 (36+) 38 — — 69 (52+)	31 — — 50 (43+) 42 — — 64 (52+)	40 — — 59 (49+) 42 — — 55 (50+)	46 — — 64 (52+) 41 — — 46 (43+)
H 2	99 — — 124 (112+)	64 — — 107 (92+)	80 — — 108 (90+)	
A 11 kg	39 — — 45 (41+) 46 — — 52 (50)	32 — — 44 (38+) 46 — — 70 (57)	43 — — 51 (46+)	39 — — 42 (40+)
w. Wi. 16 kg	41 — — 55 (48)	41 — — 64 (55)	57 — — 67 (64)	54 — — 74 (66)
St. 20 kg	35 — — 47 (43) 81 — — 95 (86)	52 — — 64 (55) 48 — — 59 (54)	57 — — 76 (64)	76 — — 85 (82)
schw. H. 20 kg	39 — — 52 (45) 56 — — 88 (69) 53 — — 63 (57)	70 — — 84 (76) 47 — — 73 (61) 39 — — 67 (53)	63 — — 82 (74) 54 — — 61 (57+) 49 — — 67 (53)	67 — — 76 (70) 50 — — 60 (56) 42 — — 57 (52)
Li. 14,5 kg	43 — — 61 (53)	63 — — 78 (57)		
Jgd. 20 kg	59 — — 83 (72+)	59 — — 71 (64+)	51 — — 71 (61+)	57 — — 72 (68+)
Wo. 24 kg	84 — — 98 (88) 70 — — 98 (78+) 55 — — 76 (64)	72 — — 98 (88) 67 — — 89 (77)	62 — — 105 (84) 66 — — 82 (73)	79 — — 88 (82+) 60 — — 85 (71)
Loewe 24 kg	90 — — 105 (98)	73 — — 88 (78)	66 — — 85 (76)	57 — — 96 (75)
br. H. 19 kg	64 — — 75 (70)	61 — — 67 (63)	44 — — 77 (59)	48 — — 62 (58)
a. H. 17 kg	50 — — 68 (57+) 44 — — 51 (49+)	32 — — 56 (45+)	77 — — 95 (84+)	57 — — 87 (72+)

+ In diesen Versuchen wurde das Filtrat mit Kreatininbelastung bestimmt.

Tabelle 4. *Schwankungen von Diurese und Inulin-Clearance.*

Hund	Mittelwerte aus 3—12 Sammelperioden für Harnmenge in ccm. In Klammern entsprechende Clearance			Größte Werte für Harnmenge in ccm. In Klammern entsprechende Clearance		
schw. H. 20 kg	1,0 (61) 1,4 (82) 0,75 (70)	1,1 (66) 1,7 (88) 0,8 (74)	1,0 (76) 1,6 (58) 2,1 (69)	1,3 (53) 2,5 (95) 1,0 (70)	2,5 (71) 2,5 (85) 1,3 (63)	2,0 (78) 2,8 (59) 3,0 (88)
St. 20 kg	0,7 (57) 1,1 (77)	0,92 (43)	1,6 (47)	1,0 (54) 1,4 (81)	1,6 (47)	2,2 (47)
w. Wi. 18 kg	0,65 (48) 0,56 (66)	0,82 (55)	0,74 (62)	0,91 (42) 0,8 (72)	1,39 (42)	1,2 (52)
br. H. 19 kg	1,1 (63)	1,3 (87)		2,9 (61)	1,6 (75)	
A. 10 kg	0,82 (50)			1,0 (50)		
Li. 15 kg	0,95 (53)	1,16 (67)	0,76 (67)	1,9 (62)	1,9 (76)	1,6 (63)

Die zugehörigen Werte stehen an den einander entsprechenden Stellen der Tabelle.

selben Menge intravenös betrug es 32 ccm. Im 2. Versuch war das Filtrat nach 3 ccm/Min. Wasser per os 73 ccm, nach 3,6 ccm/Min. 0,83%iger Kochsalzlösung intravenös 39 ccm. Auch in einem 3. Versuch waren nach 1,5 ccm Leitungswasser per os bzw. Kochsalzinfusion die Filtratwerte mit 70 bzw. 30 ccm entsprechend. In einem 4. Versuche wurde 0,85%ige Kochsalzlösung, anfangs in einer Menge von 2 ccm/Min., später von 0,8 ccm/Min. (bei gleichzeitiger oraler Wassergabe) infundiert. Die entsprechenden Filtratwerte betrugen 61 bzw. 112 ccm.

Über die Beeinflussung der Inulin- und Kreatinin-Clearance durch Atropin wird gesondert berichtet.

Besprechung der Ergebnisse.

Da der Vergleich der Clearance von endogenem Kreatinin und Inulin ergeben hat, daß die Kreatinin-Clearance wesentlich niedriger ist als die des Inulins, wird endogenes Kreatinin entweder rückresorbiert, oder eine zusätzliche chromogene Substanz im Plasma, die nicht im Harn ausgeschieden wird, erhöht den Plasmawert. Gegen eine Rückresorption von endogenem Kreatinin spricht die gleichmäßige Ausscheidung bei verschiedener Diuresehöhe. Im Gegensatz zu den günstigeren Befunden von Miller und Dubos[3] am Menschen müssen wir also beim Hund mit einer Störung durch eine chromogene Substanz im Plasma rechnen. Da das endogene Kreatinin beim Hund als Filtrattestsubstanz nicht brauchbar ist, ist es weiterhin nicht möglich, die wahre Filtratgröße während der Grunddiurese festzustellen; denn die bisher geübte Zufuhr von Testsubstanzen verändert die Grunddiurese. Bei Verwendung von zugeführtem Kreatinin zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Clearance mit der durch Inulin bestimmten, so daß für den Hund unter *normalen* Bedingungen Kreatininbelastung zur Filtratbestimmung geeignet ist. Die Filtration schwankt beim einzelnen Tier an verschiedenen Versuchstagen nur wenig und bleibt auch während eines Versuches mit großen Diureseschwankungen ziemlich gleichmäßig. Dabei ist die Filtratbestimmung immer durch die Schwierigkeit der Interpolation belastet; denn auf 3 Harnentnahmen fällt nur eine Blutentnahme. In Wirklichkeit sind die Filtrate während eines Versuches wahrscheinlich noch gleichmäßiger.

Da die unter Infusionsbelastung auftretenden zum Teil großen Diureseschwankungen nicht durch Filtrationsschwankungen zu erklären sind, müssen sie durch Änderung der Rückresorption oder Sekretion hervorgerufen sein. Nach der Zufuhr einer größeren Menge von Wasser und Kochsalzlösung intravenös wird die Filtration beträchtlich vermindert. Es handelt sich wohl um eine Schädigung des Filters durch Veränderung des kolloiden Milieus. Deshalb wurde in der Mehrzahl der Versuche nur 0,7 ccm Flüssigkeit/Min. infundiert.

Zusammenfassung.

1. An Hunden wurden Clearancebestimmungen mit endogenem Kreatinin, sowie Kreatinin- und Inulinbelastung durchgeführt.

2. Das endogene Kreatinin ist beim Hund zur Filtratbestimmung ungeeignet. Das Filtrat der Grunddiurese ist also bisher nicht bestimmbar.

3. Die Clearancewerte unter Kreatinin- und Inulinbelastung stimmen überein.

4. Die Schwankungen der Filtration an verschiedenen Versuchstagen sowie während eines Versuches sind sogar bei großen Diureseschwankungen gering. Diese können daher nur durch geänderte Rückresorption oder Sekretion zustande kommen.

5. Infusion größerer Mengen von Wasser oder Kochsalzlösung schädigt die Filtration.

Aus dem Pharmakologisch-Pharmakognostischen Institut der früheren Deutschen Karls-Universität in Prag (Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky).

Diurese, Filtration und Sekretion der Niere unter dem Einfluß verschiedener Pharmaka.

III. Mitteilung.

Über den Einfluß des Atropins auf die Nierenfunktion des Hundes einschließlich Sekretion des Phenolrots.

Von

G. Kuschinsky und H. Langecker.

(Eingegangen am 4. Oktober 1944.)

Die in vorangegangenen Arbeiten[1] bei Infusionsbelastung beobachteten großen Diureseschwankungen sind nicht durch Schwankungen der Filtration zu erklären; sie können daher nur durch Änderung der Rückresorption oder durch Sekretion hervorgerufen sein. Die früher erwähnten Unstimmigkeiten der herrschenden Anschauungen über die Harnbildung und die dadurch bedingte Schwierigkeit in der Erklärung der Wirkung der Diuretika veranlaßte uns, eine Beteiligung der Sekretion an der Harnbildung näher zu prüfen. Als Kriterium der Sekretion wählten wir einerseits in Analogie zu Wirkungen an anderen Drüsen die Atropinwirkung; andererseits versuchten wir den Nachweis zu erbringen, daß die bekannte Sekretion des Phenolrots von einer Wassersekretion begleitet und daß Phenolrot- und Wassersekretion ihrerseits durch Atropin gehemmt würde. Hemmende Atropinwirkungen auf die Diurese sind in der älteren Literatur schon mehrfach beschrieben worden[2], ohne daß an eine Hemmung der Sekretion gedacht wurde. Später haben Brogsitter und Dreyfuss[3] beim Menschen nach 1 mg Atropin subkutan die Diurese nach Wasserstoß für viele Stunden hinauszögern können. Diese Autoren „vermuten, daß die Wirkung des Atropins auf die Niere des Menschen auch spezifisch sekretionshindernd ist". In neuerer Zeit haben Ssargin und Nussinboim[4] bei Mäusen nach großen Dosen Atropin eine Diuresehemmung beobachtet, welche sie auf die zentralerregende Wirkung des Atropins beziehen. Sonstige neuere Untersuchungen an größeren Versuchsreihen und mit moderner Methodik liegen nicht vor. Wir haben daher im folgenden untersucht: den Ein-

---

[1] Kuschinsky, G. u. H. Langecker: Arch. exp. Path. (D) **204**, 699, 710 (1947). — Dtsch. med. Wschr. **69**, 695 (1943). — [2] Heffter: Handbuch der Pharmakologie, Bd. **II/2**, S. 621, **1924**. — [3] Brogsitter, A. u. W. Dreyfuss: Arch. exp. Path. (D) **107**, 349 (1925). — [4] Ssargin, K. D. and B. E. Nussinboim: Arch. internat. Pharmacodynam. **57**, 195 (1937).

fluß des Atropins auf die Nierenfunktion während einer intravenösen Infusion ohne und mit gleichzeitiger Wasserbelastung per os und die Atropinwirkung auf einen Wasserstoß, ferner die Wirkung von Phenolrot auf die Wasserdiurese und ihre Beeinflussung durch Atropin, sowie die Atropinwirkung auf Ausscheidung und Sekretion des Phenolrots.

Methodik.

Die Methodik wurde zum größten Teil in den vorigen Arbeiten[1] mitgeteilt. In dieser Arbeit wurde in vielen Versuchen gleichzeitig mit dem Kreatinin bzw. Inulin auch Phenolrot (als Sekretionstest) in einer Konzentration von 75—750 mg-% infundiert. Die Plasmawerte lagen zwischen 0,35—2 mg-%, in den meisten Versuchen zwischen 0,8—1 mg-%. Die Ausscheidung des Phenolrots setzt sich zusammen aus dem filtrierten und sezernierten Anteil. Die in der Minute filtrierte Menge ist gleich: filtrierte Harnmenge × mg-% Phenolrot im Plasma: 100. Die sezernierte Menge ist ausgeschiedene weniger filtrierte Menge. Wegen der Anwesenheit von Phenolrot mußte die Kreatininbestimmung modifiziert werden.

Kreatininbestimmung in Anwesenheit von Phenolrot. Die mit alkalischer Pikrinsäure entstehenden roten Farben von Phenolrot und Kreatinin sind einander so ähnlich, daß es nicht gelungen ist, sie durch Farbfilter zu trennen. Auch der Versuch, einen Summenwert zu bestimmen und davon den direkt bestimmbaren Phenolrotwert in Abzug zu bringen, scheiterte, da sich die beiden Farbtöne nicht addieren. Das von MARSHALL[5] angegebene Kompensationsverfahren ließ sich mit dem HAVEMANN-Kolorimeter nicht durchführen. Das Phenolrot mußte daher vor der Kreatininbestimmung entfernt werden. Phenolrot ist außerordentlich resistent, es läßt sich ohne Kreatininverlust nicht durch Zerstörung beseitigen. Auch Adsorptionsversuche mißlangen, hingegen läßt sich Phenolrot bei sauerer Reaktion gut mit Amylalkohol ausschütteln. Bei der kolorimetrischen Bestimmung stört aber die Anwesenheit des im Wasser gelösten Amylalkohols. Bei der Bestimmung des Kreatinins im Plasma muß daher der gelöste Amylalkohol nachträglich mit Petroläther entfernt werden. Bei der Kreatininbestimmung im Harn, der nach der Extraktion auf das Hundertfache verdünnt werden muß, stören die Reste an Amylalkohol nicht. Um Konzentrationsverschiedenheiten zu vermeiden, wurde der zur Extraktion bestimmte Amylalkohol mit Wasser gesättigt. Es wurde demnach folgendermaßen gearbeitet:

1. Plasma. 40 ccm des mit Cadmiumhydroxyd enteiweißten Plasmas, mit 1 ccm 2 n Salzsäure versetzt, wurde 4—5mal mit gleichen Teilen mit Wasser gesättigtem Amylalkohol ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wird durch ein trockenes Filter filtriert und in einem reinen Scheidetrichter 3mal zu gleichen Teilen mit Petroläther ausgeschüttelt. Sie wird dann neuerlich filtriert und mit 10% Natronlauge vor dem Anstellen der Farbreaktion neutralisiert. Bei Werten über 10 mg-% Kreatinin können die Fehler bis zu 10% betragen, unter 10 mg-% sind die Werte unbrauchbar.

2. Harn. Wegen der Amylalkoholextraktion muß auch der Harn mit Cadmiumhydroxyd gefällt werden. 40 ccm Cadmiumhydroxydfällung, mit 1 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt, wurde 6mal mit gleichen Teilen mit Wasser gesättigtem Amylalkohol ausgeschüttelt und auf Grund einer Vorprobe mit der zur Neutralisation der Salzsäure notwendigen Menge 10%iger Natronlauge vor dem Durchführen der Farbreaktion versetzt.

[5] MARSHALL, E. K.: Amer. J. Physiol. **99**, 77 (1931). — A. N. RICHARDS, P. A. BOTT and B. B. WESTFALL: Amer. J. Physiol. **123**, 281 (1938).

Für die merkurimetrische *Chlorid*-Bestimmung im Harn und Plasma wurde das vorhandene Phenolrot in dem Zinkfiltrat mit $KMnO_4$ bei schwefelsaurer Reaktion zerstört und nachher mit ZnO neutralisiert (Kuschinsky und Langecker[6]). Die jodometrische Bestimmung nach Haslewood und King, die sich auch für die Bestimmung im Harn nach vorangegangener Zinkfällung eignet, ist in Anwesenheit von Phenolrot durchführbar.

Phenolrotbestimmung. Die Bestimmung erfolgte nach Corcoran und Page[7]. Im Plasma wurde mit n/10 Natronlauge, im Harn mit Zitratpuffer von p_H 12 die für die Kolorimetrie geeignete Farbreaktion angestellt und unter Verwendung des Grünfilters V G 9 Stärke 2 mm kolorimetriert. Der Leerwert des Harns spielte bei den großen Verdünnungen keine Rolle, für das Plasma wurde der Farbwert des Kontrollplasmas in Abzug gebracht. Im hämolytischen Plasma muß eine Korrektur für den Farbwert des bei p_H 12 gebildeten Methämoglobins gemacht werden. Da kein geeignetes, für Phenolrot undurchlässiges Filter vorlag, wurde im Plasma die Intensität der Absorption des Blutfarbstoffes ermittelt. Bei p_H 6,6 zeigt Phenolrot in den niedrigen Konzentrationen, die zur Bestimmung kommen, keine Absorption. Es wurde daher das Plasma zu gleichen Teilen mit Phosphatpuffer von p_H 6,6 versetzt und mit dem Handspektroskop bei konstanter Einstellung die Stärke der Absorption des Blutfarbstoffes geschätzt und der im Kontrollversuch ermittelte, der Absorption entsprechende Farbwert des Methämoglobins in Abzug gebracht. Bei schonenden, rasch durchgeführten Blutentnahmen war die Hämolyse oft so niedrig, daß keine Korrektur erforderlich war. Anfangs wurde zur Verhinderung der Gerinnung in den Zentrifugenröhrchen eine 4%ige Ammonoxalatlösung (1 ccm für 10 ccm Blut) im Thermostat zur Trockne gebracht. Dabei kann gelegentlich durch starke Erhitzung Ammonkarbonat gebildet werden, das hämolytisch wirkt. Seit der Verwendung der entsprechenden Menge Ammonoxalat in Substanz waren die Proben praktisch nicht mehr hämolytisch, mit Ausnahme von seltenen Fällen schwieriger Blutentnahme. Die für die Kolorimetrie benützten Harnverdünnungen wurden auch spektroskopisch auf Anwesenheit von Blutfarbstoff bei Verletzungen durch das Katheterisieren geprüft, dieser konnte durch Adsorption an Kieselgur entfernt werden. Es wurde zu 40 ccm Flüssigkeit etwa $^3/_4$ g Kieselgur zugesetzt, durchgeschüttelt und filtriert.

Versuchsergebnisse.

Mit Rücksicht auf die hohe Unempfindlichkeit und Toleranz des Hundes gegen Atropin haben wir neben kleineren in der Mehrzahl der Versuche sehr große Atropingaben verwendet, um möglichst starke Wirkungen zu erzielen. Aufregungszustände verschiedener Grade wechselten mit narkoseähnlichen Bildern, Stuhlentleerung und Erbrechen kamen häufig vor, selten trat eine Blaseninkontinenz auf. Die Tiere überlebten die Vergiftung immer.

1. Einfluß des Atropins auf die Nierenfunktion während einer intravenöser Infusion.

a) Einfluß auf Wasser-, Natrium- und Chloridausscheidung. Die durch die Infusion erzeugte zum Teil beträchtliche Mehrausscheidung

[6] Kuschinsky u. Langecker: Biochem. Z. im Druck — [7] Corcoran and Page: Amer. J. Physiol. **126**, 354 (1939).

von Wasser, Chlorid und Natrium wurde in 11 von 13 Versuchen durch Atropin. sulfuric. intravenös in Dosen von 2—200 mg gehemmt (s. Tabelle 1). Das Ausmaß der Hemmung ist verschieden stark. Diese Atropinwirkung macht sich sofort bemerkbar bis auf Versuch 122, bei dem in der ersten Atropinperiode noch der Infusionsreiz feststellbar ist. Die Dauer der Wirkung schwankt zwischen einer und dem Maximum der Beobachtungszeit von neun Stunden.

Im Falle einer hemmenden Atropinwirkung auf die Diurese ist die Chloridausscheidung verhältnismäßig noch stärker gehemmt. Natrium verhält sich bis auf eine Ausnahme gleichsinnig wie Chlorid. Wenn die Diurese wieder in Gang kommt, wird mitunter Chlorid und Natrium vermehrt ausgeschieden. In 2 von 13 Versuchen ging die Wasserausscheidung trotz Atropin auf etwa das Doppelte hinauf. Ob sie ohne Atropin höher gestiegen wäre, läßt sich nicht entscheiden; Chlorid und Natrium verhielt sich in einem Falle entsprechend, im anderen wurde die Chloridausscheidung gehemmt. Zwei weitere abweichende Chloridausscheidungen waren auf besondere Belastung zurückzuführen (Versuch 33 und 35).

b) Einfluß auf die Clearance von endogenem, exogenem Kreatinin und Inulin.

Die Clearance des *endogenen Kreatinins* war bei 5 Versuchen 2mal auf 60—70% vermindert, sonst unverändert (s. Tabelle 1). Nach *Belastung mit Kreatinin* war dessen Clearance bei 6 Beobachtungen 3mal völlig unverändert, 2mal wenig gesenkt und 1mal auf die Hälfte herabgesetzt. In diesem Versuch stieg die Plasmakonzentration des Kreatinins auf 130%, während sie in den anderen Versuchen gleichblieb. — Die Clearance des *Inulins* war bei 5 Versuchen 2mal unverändert, 1mal wenig und 2mal deutlich gesenkt. In 2 von diesen Versuchen (117, 122) bezieht sich die Senkung nicht auf die Vorperiode, sondern sie war erst im Verlaufe der Atropinwirkung festzustellen. Die Vorperiode war hier zu kurz, um eine Clearancebestimmung durchzuführen. In diesen und weiteren Versuchen (118, 119, 121) hatte aber die unter Atropinwirkung beobachtete Clearance etwa dieselbe Größe, wie sie auch in anderen Versuchen an jeweils demselben Hund ermittelt wurde. In einem 6. Versuch (88) blieb die Inulinclearance gegenüber einer längeren Vorperiode unverändert. Die Plasmakonzentration stieg auf 120% an.

2. Einfluß des Atropins auf die Nierenfunktion während einer intravenösen Infusion nach vorheriger Einwirkung verschiedener Pharmaka.

In weiteren 14 Versuchen wurde im Anschluß an die Verabfolgung von verschiedenen, aus anderen Gründen verabreichten Pharmaka

Tabelle 1. *Einfluß des Atropins auf die Nierenfunktion während einer intravenösen Infusion. (Die Zahlen bedeuten Mittelwerte.)*

Versuch Nr.	Hund	Belastung	Vor bzw. nach Atropin	Harnsammelperioden	Ausscheidung je Minute					Clearance		Phenolrot	
					Harn	endogenes Kreatinin	Inulin bzw. exogenes Kreatinin	Chlorid	Natrium	endogenes Kreatinin	Inulin bzw. exogenes Kreatinin	Ausscheidung	Sekretion
					ccm	mg		Mikro-Mol		ccm		mg/Min.	
122	Li.***	0,6 % NaCl 1,8 % Inulin	vor	1	0,26	0,35	—	88	68	32	—	—	—
				2*	1,00	0,43	9,2	283	237	36	—	—	—
		0,7 ccm/Min.	nach 50 mg	5— 7	0,26	0,31	9,3	8,9	6,8	22	56	—	—
				8—10	0,17	0,25	8,3	3,7	6,7	23	38	—	—
				11—12	0,34	0,39	12,2	6,7	50	33	55	—	—
117	Li.***	0,6 % NaCl 2,1 % Inulin	vor	1	0,3	0,33	—	100	73	12	—	—	—
		0,7 ccm/Min.	nach 150 mg	2—6	0,2	0,26	7,1	6,2	15	14	44	—	—
				7—9	0,43	0,44	8,0	28	100	22	50	—	—
121	schw. H. ***	0,7 % NaCl 2,8 % Inulin	vor	1	0,35	0,71	—	70	31	45	—	—	—
				2	0,17	0,47	7,0	29	4	27	—	—	—
		0,7 ccm/Min.	nach 150 mg	3— 7	0,46	0,65	9,4	84	28	34	55	—	—
				8—15	0,65	0,77	9,1	120	156	40	57	—	—
51	schw. H.	0,6 % NaCl 1,2 % Kreatinin	vor	1	0,19	—	—	15	—	—	—	—	—
				2—3	0,25	—	3,4	32	—	—	53	—	—
				4—7	0,40	—	4,6	43	—	—	57	—	—
		0,7 ccm/Min.	nach 2 mg	8—10**	0,36	—	5,2	35	—	—	55	—	—
			nach 150 mg	14—17	0,29	—	4,7	18	—	—	46	—	—
				18—19	0,42	—	6,7	45	—	—	61	—	—

118	w. Wi. ***	0,6% NaCl 1,7% Inulin	vor	1	0,22	0,29	—	39	29	25	—	—	—
		0,7 ccm/Min.	nach 50 mg	2	0,66	0,37	8,1	119	111	30	—	—	—
				3— 5	0,35	0,33	6,9	20	27	25	57	—	—
				6— 9	0,54	0,34	8,1	51	81	27	57	—	—
				10—15	0,72	0,41	8,9	94	170	35	64	—	—
119	St.***	0,6% NaCl 1,8% Inulin	vor	1	0,32	0,34	—	19	13	31	—	—	—
		0,7 ccm/Min.	nach 50 mg	2— 7	0,70	0,50	8,6	96	46	43	64	—	—
				8—11	0,99	0,49	8,7	42	59	41	59	—	—
				12—20	1,10	0,59	9,5	49	125	48	59	—	—
34	Jgd.	1,2% NaCl 0,7% Kreatinin	vor	11—14	1,20	—	9,9	0,15	—	—	81	—	—
		1,6 ccm/Min.	nach 200 mg	15—19	0,71	—	9,1	0,11	—	—	72	—	—
30	b. Wi.	0,85% NaCl 1,0% Kreatinin 226 mg-% Phenolrot	vor	8—12	0,56	—	5,1	70	—	—	36	2,8	1,9
		1,3 ccm/Min.	nach 200 mg	12—17	0,43	—	5,8	50	—	—	41	2,2	1,03
35	b. Wi.	destilliertes Wasser 1,25% Kreatinin 160 mg-% Phenolrot	vor	10—13	0,84	—	18	75	—	—	45	1,59	0,87
		1,6 ccm/Min.	nach 200 mg	14—17	0,70	—	20	85	—	—	55	1,67	0,32

* In den Perioden 3—4 fiel die Infusion durch einen technischen Fehler aus. Die spontan entleerten Harnmengen waren sehr niedrig und konnten nicht analysiert werden.

** In den Perioden 11—13 fiel die Infusion aus technischen Gründen aus.

*** Diese Atropinversuche sind mit den entsprechenden ohne Atropin an jeweils demselben Hund in den früheren Arbeiten zu vergleichen.

Tabelle 1. (Fortsetzung.)

Versuch Nr.	Hund	Belastung	Vor bzw. nach Atropin	Harnsammelperioden	Ausscheidung je Minute					Clearance		Phenolrot	
					Harn	endogenes Kreatinin	Inulin bzw. exogenes Kreatinin	Chlorid	Natrium	endogenes Kreatinin	Inulin bzw. exogenes Kreatinin	Ausscheidung	Sekretion
					ccm	mg		Mikro-Mol		ccm		mg/Min.	
88	Lö.	0,6% NaCl 2,7% Inulin 230 mg-% Phenolrot 0,7 ccm/Min.	vor	3—7	1,90	—	17	170	—	—	76	1,22	0,49
			nach 50 mg	8—13	3,30	—	18	116	—	—	71	1,23	0,44
			200 mg	14—18	1,60	—	21	75	—	—	77	1,43	0,35
				19—20	0,86	—	—	20	—	—	—	0,66	0,08
33	a. H.	destilliertes Wasser 0,8% Kreatinin 1,6 ccm/Min.	vor	11—14	0,73	—	8,7	1,0	—	—	32	—	—
			nach 200 mg	15—17	0,64	—	5,3	1,9	—	—	15	—	—

Atropin intravens in Dosen von 2—200 mg gegeben (s. Tab. 2). In allen diesen Fällen hemmte Atropin die *Harnausscheidung*, in einigen Fällen auf 30—40%. Bei nur geringer Wirkung in 4 Fällen lag die Harnausscheidung ohnehin schon im Bereich oder fast im Bereich der Grunddiurese. In denselben Versuchen wurde die *Chlorid*- und *Natrium*-Ausscheidung in den meisten Fällen noch stärker als die Wasserausscheidung gehemmt. Dabei war Natrium wiederum stärker beteiligt als Chlorid. Chlorid und Natrium zeigten im Gegensatz zum Wasser bereits nach 2 mg Atropin eine deutliche Hemmung. Nur im Versuch 39 war Chlorid trotz Natriumsenkung um 20% vermehrt; auch die Wasserausscheidung war hier kaum beeinflußt. Die Clearance nach Kreatininbelastung wurde durch Atropin in den meisten Fällen in demselben Ausmaß gesenkt wie die Wasserausscheidung. Die

Plasmakonzentration des Kreatinins blieb in 3 von 10 Versuchen unverändert und stieg in 7 Versuchen auf 110—160% an. Die Inulinclearance war in 3 von 4 Fällen unverändert, im Versuch 54 auf 43% gesenkt bei einer Diuresehemmung auf 28%. Die Plasmakonzentration des Inulins blieb in 3 Versuchen unverändert, im Versuch 54 stieg sie auf 150% an.

3. Einfluß des Atropins auf die Nierenfunktion während einer intravenösen Infusion und gleichzeitiger Wasserbelastung per os.

In 5 derartigen Versuchen (s. Tabelle 3) wurde die Harnausscheidung durch Atropin in Dosen von 150—300 mg intravenös beträchtlich vermindert (auf 15—40%), die nur in 3 Versuchen geprüfte Chloridausscheidung war 2mal vermindert, 1mal etwas vermehrt. Die Kreatininclearance war in den meisten Fällen etwas vermindert, die Plasmakonzentration blieb in 3 Fällen unverändert und stieg in 2 Versuchen auf 110—130% an.

4. Einfluß des Atropins auf die Nierenfunktion während Wasserbelastung per os.

Da wir bei der geschilderten Versuchsanordnung nach Atropin gelegentlich Erbrechen von größeren Wassermengen beobachteten, hatten wir den Verdacht, daß durch Atropin vielleicht beim Hund ein Spasmus des Pylorus zu einer Hemmung der Magenentleerung führen könnte. Wir haben deshalb in einer weiteren Versuchsreihe diese Möglichkeit berücksichtigt. Als Grundlage hierfür haben wir den einfachen Wasserstoß gewählt. Dabei zeigte sich, daß auch an demselben Tier an verschiedenen Tagen eine verschieden hohe Änderung der Wasser- und Chloridausscheidung nach Wasserstoß auftritt (s. Tabelle 4). Bei einer niedrigen Ausgangsdiurese ist eine größere Wirkung des Wasserstoßes zu beobachten. Entsprechend ist das Verhalten des Chlorids während der Vorperiode und unter den Bedingungen des Wasserstoßes, unter denen allerdings die Beeinflussung des Chlorids geringer ist. — Wir haben deshalb an demselben Tier mehrere Wasserstoßversuche unter Atropin durchgeführt (s. Tabelle 4) und zum Vergleich Kontrollversuche mit entsprechenden Ausgangsbedingungen in Bezug auf Wasser- und Chloridausscheidung gegenübergestellt (s. Tabelle 5). Das Atropin wurde erst 1 Stunde nach der Wasserfütterung gegeben, so daß angenommen werden kann, daß das Wasser in dieser Zeit bereits den Magen verlassen hat. In den Versuchen 2, 4, 6 und 8 ist die Diurese durch Atropin sehr stark beeinträchtigt (auf 10—40%), die Chloridausscheidung hingegen nicht. Im Versuch 8 und 13 mit kleiner Atropindosis war in der ersten Stunde der Wasserstoß noch bemerkbar und erst von der zweiten Stunde machte sich die Atropinwirkung geltend.

Tabelle 2. *Einfluß des Atropins auf die Nierenfunktion während einer intravenösen Infusion nach vorheriger Einwirkung verschiedener Pharmaka. (Die Zahlen bedeuten Mittelwerte.)*

Versuch Nr.	Hund	Belastung	Pharmakon vor bzw. während der Atropinphase	Vor bzw. nach Atropin	Harnsammelperiode	Ausscheidung je Minute				Clearance	Phenolrot	
						Harn	Inulin bzw. Kreatinin	Cl	Na	Inulin- bzw. exogenes Kreatinin	Ausscheidung	Sekretion
						ccm	mg	Mikro-Mol		ccm	mg/Min.	
37	b. Wi.	0,6% NaCl 0,8% Kreatinin 75 mg-% Phenolrot 1,6 ccm/Min.	5 mg Arecolin in der Vorperiode	vor	12—15	0,65	13,9	70	102	69	1,0	0,55
				nach 200 mg	16—19	0,46	11,0	41	40	49	0,94	0,41
75	b. He.	0,7% NaCl 2,8% Inulin 240 mg-% Phenolrot 0,7 ccm/Min.	0,6 E. Orasthin je Stunde in der Vorperiode	vor	8—14	0,99	11,0	133	190	63	1,12	0,65
				nach 200 mg	15—18	0,38	10,7	58	31	66	1,01	0,44
42	A.	0,75% NaCl 1,2 % Kreatinin 240 mg-% Phenolrot 0,6 ccm/Min.	40—120 γ-% Dorylin fundiert in der Vorperiode	vor	12—16	0,30	7,0	42	34	40	1,5	0,83
				nach 50 mg	17—19	0,27	6,8	31	23	36	1,50	0,85
46	A.	0,6% NaCl 1,1% Kreationin 230 mg-% Phenolrot 0,7 ccm/Min.	20 mg-% Nikotin infundiert vor und während der Atropinphase	vor	8—13	0,22	6,6	37	28	46	1,1	0,44
				nach 200 mg	14—17	0,19	6,6	14	10	36	1,1	0,40

50	A.	0,6% NaCl 1,2% Kreatinin 260 mg-% Phenolrot 0,7 ccm/Min.	20 mg-% Nikotin infundiert vor und während der Atropinphase	vor	7—13	0,35	6,5	43	23	42	1,18	0,6
				nach 50 mg	14 15—16	0,26 0,28	5,7 8,0	29 22	12 11	30 46	1,19 1,67	0,77 0,95
39	a. H.	0,6% NaCl 1,75% Kreatinin 240 mg-% Phenolrot 0,65 ccm/Min.	15—225 γ-% Doryl infundiert in der Vorperiode	vor	11—15	0,61	7,9	42	50	58	1,42	0,77
				nach 50 mg	16—18	0,56	7,4	52	36	39	1,07	0,59
41	a. H.	0,6 % NaCl 1,3 % Kreatinin 245 mg-% Phenolrot 0,65 ccm/Min.	8,5—34 γ/kg/Min. Sympatol infundiert in der Vorperiode	vor	11—15	0,77	6,0	166	172	43	1,26	0,72
				nach 50 mg	16—19	0,29	5,7	39	17	34	1,1	0,56
44	Wo.	0,7% NaCl 1,14% Kreatinin 230 mg-% Phenolrot 0,7 ccm/Min.	0,7 mg/kg/Stunde Nikotin infundiert in der Vorperiode	vor	13—18	0,68	7,0	102	117	82	0,99	0,50
				nach 15 mg	19—21	0,47	6,4	45	39	62	1,0	0,64
48	Wo.	1,0% NaCl 1,56% Kreatinin 260 mg-% Phenolrot 0,7 ccm/Min.	11 γ/kg/Min. Acetylcholin infundiert vor und während der Atropinphase	vor	8—16	0,83	8,6	203	170	71	1,3	1,25
				nach 2 mg	17—20	0,79	9,1	161	120	82	1,25	0,43
				200 mg	21—22	0,29	5,0	40	28	34	0,83	0,44 teils RR.*
54	Wo.	0,75% NaCl 4,0% Inulin 375 mg-% Phenolrot 0,7 ccm/Min.	0,5 mg subkutanes Physostigminsalicylic. in der Vorperiode	vor	8—15	1,34	29	132	197	88	2,2	1,01
				nach 200 mg	18 19—20	0,23 0,45	5,8 23	48 90	32 61	14 49	0,44 1,9	0,1 RR.:19. P.**

* RR Rückresorption. ** RR: 19. P. Rückresorption in der 19. Periode.

Tabelle 2. (Fortsetzung.)

Versuch Nr.	Hund	Belastung	Pharmakon vor bzw. während der Atropinphase	Vor bzw. nach Atropin	Harnsammelperiode	Ausscheidung je Minute				Clearance	Phenolrot	
						Harn	Inulin bzw. Kreatinin	Cl	Na	Inulin bzw. exogenes Kreatinin	Ausscheidung	Sekretion
						ccm	mg	Mikro-Mol		ccm	mg/Min.	
58	Wo.	0,6% NaCl 3,0% Inulin 280 mg-% Phenolrot 0,7 ccm/Min.	0,6 g Coffein purum i.m. in der Vorperiode	vor	13—16	0,41	17	68	53	85	1,49	0,7
				nach 200 mg	17—19	0,34	16,9	44	61	89	1,34	0,12
73	schw. H.	0,6% NaCl 2,4% Inulin 230 mg-% Phenolrot 0,7 ccm/Min.	0,6 E. Orasthin je Stunde infundiert vor und während der Atropinphase	vor	7—14	0,83	19,9	94	171	81	1,03	0,37
				nach 200 mg	15—18	0,42	15	63	58	82	0,91	0,058: 15. P. RR.: 16.—18. P.
36	Jgd.	0,6% NaCl 0,8% Kreatinin 75 mg-% Phenolrot 1,6 ccm/Min.	5 mg Arecolin i.v. in der Vorperiode	vor	13—16	2,5	13	240	290	86	1,0	0,62
				nach 200 mg	17—20	1,25	12,2	103	165	86	0,96	0,53
38	Jgd.	0,6% NaCl 2,5% Kreatinin 240 mg-% Phenolrot 0,65 ccm/Min.	0,125—0,625 mg-% Dorylinfundiert in der Vorperiode	vor	11—14	0,63	8,3	57	62	46	1,16	0,94
				nach 200 mg	15—17	0,45	7,5	29	31	35	1,02	0,78

Tabelle 3. *Einfluß des Atropins auf die Nierenfunktion während einer intravenösen Infusion und gleichzeitiger Wasserbelastung per os. (Die Zahlen bedeuten Mittelwerte.)*

Versuch Nr.	Hund	Belastung	Vor bzw. nach Atropin	Harnsammelperiode	Ausscheidung je Minute			Clearance	Phenolrot	
					Harn	Inulin bzw. exogenes Kreatinin	Chlorid	Inulin bzw. exogenes Kreatinin	Ausscheidung	Sekretion
					ccm	mg	Mikro-Mol	ccm	mg/Min.	
13	H. 2	i.v. 0,85% NaCl, 2% Kreatinin, 800 mg-% Phenolrot	vor	5—10	1,70	20,4	—	112	5,6	2,67
		0,8 ccm/Min. zusätzlich 2 ccm/Min. Leitungswasser	nach 150 mg	11—15	0,55	12,5	—	87 (11.P.: 50)	3,9	1,77
15	H. 2	i.v. 0,75% NaCl, 1% Kreatinin, 580 mg-% Phenolrot	vor	3—9	1,20	6,5	—	92	2,0	1,3
		1 ccm/Min. zusätzlich 2 ccm/Min. Leitungswasser	nach 300 mg	11—14	0,42	7,2	—	77 (11.P.: 20)	2,0	0,81
18	b.Wi.	i.v. 0,75% NaCl, 1,45% Kreatinin, 600 mg-% Phenolrot	vor	5—9	1,10	6,3	60	49	1,87	0,8
		0,3 ccm/Min. zusätzlich 1,3 ccm/Min. Leitungswasser	nach 200 mg	12—15	0,43	4,8	20	46	1,4	0,26
22	b. Wi.	i.v. 0,85% NaCl, 4% Kreatinin, 760 mg-% Phenolrot	vor	7—11	1,70	5,7	16	44	0,88	0,36
		0,23 ccm/Min. zusätzlich 3,1 ccm/Min. Leitungswasser	nach 200 mg	12—16	0,41	5,4	20	44	0,69	0,14
23	Jgd.	i.v. 0,85% NaCl, 4% Kreatinin,	vor	3— 8	2,50	6,4	48	68	—	—
		0,23 ccm/Min. zusätzlich 2,9ccmMin. Leitungswasser	nach	9—14	0,39	5,6	14	59	—	—
			200 mg	15	1,00	4,6	15	41	—	—

Tabelle 4. *Einfluß des Atropins auf die Nierenfunktion während einer oralen Wasserbelastung. 3—4 normale Vorperioden, dann 300 ccm Leitungswasser per os. Zur Beurteilung des Wasserstoßes Benutzung der Werte erst nach 1stündiger Pause. Atropin intravenös 1 Stunde nach dem Wasserstoß. Die Versuche 1—11 wurden am Hund br. H. (9 kg) durchgeführt, Versuch 12—13 am Hund V. (6 kg) (200 ccm Leitungswasser per os), Versuch 14—15 am Hund O. (5 kg) (200 ccm Leitungswasser per os).*

Versuch Nr.	Atropin i.v.	Vor der Wasserbelastung: Harn-Ausscheidung	Vor der Wasserbelastung: Cl-Ausscheidung	Unter Wasserbelastung: Beobachtungsdauer in Stunden	Unter Wasserbelastung: Werte in % der Vorperiode: Harn	Unter Wasserbelastung: Werte in % der Vorperiode: Cl		Bemerkungen
	mg	ccm je Min.	Mikro-Mol je Min					
				ohne Atropin				
1		0,40	29	2½	370	100		
3		0,09	5,1	2	1400	300		
5		0,30	2,7	2½	550	300		
7		0,24	22	2½	730	150		
11		0,10	36	½	280	300		
12		0,10	6,0	2	1200	200		
14		0,11	37	2	80	50		
15		0,17	60	2½	70	25		
				mit Atropin				
2	80	0,04	3,7	2½	300	240		
4	80	0,14	5,1	2½	250	400		
6	80	0,49	3,1	2½	40	220	2 P.	In der folgenden Stunde großer Anstieg der Diurese- und Chloridausscheidung.
						1600	2 P.	
8	5	0,34	4,0	2	500	180	1. St.	In der folgenden Stunde wieder große Diurese.
					60	300	2. St.	
9	5	0,14	47	2½	100	75		
10	5	0,10	32	2½	160	200		
13	5	0,21	11	2	1000	400	1 P.	Nachher Anstieg von Chlorid- und Wasserausscheidung.
					170	600	3 P.	

In den Kontrollversuchen 11, 14 und 15, in denen der Ausgangsharn eine hohe Chloridkonzentration hatte, war der Wasserstoßeffekt gering oder blieb aus; daher sind auch die Versuche 9 und 10, in denen auch eine hohe Chloridkonzentration in der Ausgangsperiode vorlag, nicht als Atropinversager aufzufassen.

5. Wirkung von Phenolrot auf die Ausscheidung von Wasser, Chlorid und Natrium.

Wenn Atropin eine Sekretionshemmung erzeugen würde, so wäre zu erwarten, daß eine durch Sekretion ausgeschiedene Substanz wie Phenol-

rot gleichfalls durch Atropin in der Sekretion gehemmt würde. Es ist jedoch schwer vorstellbar, daß bei einer solchen Sekretion der Farbstoff ohne Wasser ausgeschieden werden sollte. Deshalb haben wir zunächst den Einfluß des Phenolrots auf Wasser-, Chlor- und Natriumausscheidung geprüft. In einer Gruppe von Versuchen wurde die Wirkung eines Phenolrotzusatzes zur Infusionsflüssigkeit auf die Ausscheidung untersucht. Es ergab sich (s. Tabelle 6) nur in 6 von 19 Versuchen eine Vermehrung der Wasserausscheidung, in einigen Fällen auch der Chlorid- und noch stärker der Natriumausscheidung. In 6 Versuchen blieb die Wasserausscheidung unverändert, in den übrigen war sie sogar gehemmt. Die ungleichen Ergebnisse sind vielleicht auf die ungleiche Belastung oder auch auf die bei Infusionen beobachteten Wellenbewegungen der Ausscheidung zu beziehen. Wir haben deshalb an mehreren Hunden unter den Bedingungen der Grunddiurese, also unter günstigeren Versuchsbedingungen, die Wirkung einer Phenolrotinjektion auf die Ausscheidung von Wasser geprüft. Es wurden 200—400 mg Phenolrot in 10 ccm Wasser intravenös gegeben, eine Menge, die ohne Phenolrot ohne Wirkung war. Nach Phenolrot wurde die Ausscheidung von Wasser und Chlorid in 4 von 5 Versuchen vermehrt (s. Tabelle 7). In der Beobachtungszeit von 5—6 Stunden wurde 60—80% des Phenolrots ausgeschieden.

Tabelle 5. *Vergleich der Wirkung des Wasserstoßes mit und ohne Atropin unter Zugrundelegung gleicher Wasser- bzw. Chloridausscheidung in der Vorperiode auf Grund der Versuche 1—11, Tabelle 4.*

Versuch Nr.	Ausscheidung je Minute in der Vorperiode		Harnausscheidung			Chloridausscheidung		
			in % der Vorperiode		Verhältnis des Wasserstoß-effektes	in % der Vorperiode		Verhältnis des Wasserstoß-effektes
	Harn	Chlorid	mit Atropin	ohne Atropin	mit und ohne Atropin	mit Atropin	ohne Atropin	mit und ohne Atropin
	ccm	Mikro-Mol						
2	0 04	3,7	300	730—1400	20—40	240	300	80
4	0,14	5,1	250	730	30	400	300	130
6	0,49	3,1	40	370	10	800	300	260
8	0,34	4,0	500 60	550	90 10	180 300	300	60 100

6. Atropinwirkung auf die Ausscheidung und Sekretion des Phenolrots.

In der Mehrzahl der Fälle wurde Phenolrot nach Atropin vermindert ausgeschieden, bedingt durch Verminderung zum Teil der Filtration, zum Teil der Sekretion. In einem kleinen Teil der Fälle war die Phenolrotausscheidung unverändert (s. Tabelle 1—3). Die Filtration des Phenolrots ist in bezug auf Intensität und Häufigkeit weniger vermindert als

Tabelle 6. *Wirkungen der Phenolrotinfusion auf Ausscheidung von Wasser, Chlorid und Natrium. Die zur Infusion verwendeten Kreatininkonzentrationen lagen zwischen 0,8—4%, die Inulinkonzentrationen zwischen 2,4—3,4%, die Phenolrotkonzentrationen zwischen 75—760 mg-%*. (Die Zahlen bedeuten Mittelwerte.)*

Versuch Nr.	Hund	Wasserbelastung	Ohne Phenolrot (und mit Phenolrot)		
			Harn	Cl	Na
			ccm	Mikro-Mol	
22	b. W.	200 ccm Wasser 2 Std. vor dem Versuch + 3,1 ccm Wasser/Min. per os und 0,23 ccm 0,85% NaCl/Min. i.v.	0,39 (1,70)	15 (16)	— (—)
20	b. W.	200 ccm Wasser 2 Std. vor dem Versuch + 1,9 ccm Wasser/Min. per os und 0,23 ccm 0,85% NaCl/Min. in.v.	0,63 (1,50)	74 (76)	— (—)
36	Li.	1,6 ccm 0,6% NaCl/Min. i.v.	1,40 (3,30)	130 (290)	70 (220)
41	He.	0,7 ccm 0,6% NaCl/Min. i.v.	0,45 (0,66)	86 (150)	73 (150)
62 **	b. Wi.	0,7 ccm 0,6% NaCl/Min. i. v. — (14 Tage lang doppelt NaCl im Futter)	1,09 (1,30)	220 (140)	150 (140)
39	He.	0,7 ccm 0,6% NaCl/Min. i.v.	0,75 (0,85)	80 (86)	35 (98)
35	b. He.	1,6 ccm dest. Wasser/Min. i.v.	0,35 (0,50)	22 (27)	11 (20)
30	b. Wi.	1,3 ccm 0,[illegible]5% NaCl/Min. i.v.	0,54 (0,56)	60 (70)	— (—)
37	bi. Wi.	1,6 ccm 0,6% NaCl/Min. i.v.	0,82 (0,79	90 (87)	83 (99)
43	A.	0,7 ccm 0,6% NaCl/Min. i.v.	0,29 (0,27)	61 (12)	37 (37)
42	A.	0,7 ccm 0,9% NaCl/Min. i.v.	0, 6 (0,39)	70 (65)	78 (76)
58 **	Wo.	0,7 ccm 0,6% NaCl/Min. i.v.	0,49 (0,44)	130 (70)	90 (100)
72 **	Wo.	0,7 ccm 0,6% NaCl/Min. i.v.	1,40 (1,00)	190 (90)	180 (180)
40	b. Wi.	0,7 ccm 0,6% NaCl/Min. i.v.	0,42 (0,33)	32 (68)	14 (30)
38	Li.	0,7 ccm 0,6% NaCl/Min. i.v.	1,00 (0,88)	170 (120)	100 (100)
21	Li.	200 ccm Wasser 7 Std. vor dem Versuch + 2,2 ccm Wasser/Min. per os und 0,23 ccm physiol. NaCl/Min. i.v.	2,30 (1,50)	46 (53)	— (—)

* Bezüglich Ausscheidung und Sekretion von Phenolrot siehe die entsprechenden Versuche in Tabelle 1, 2 und 3.

** In diesen Versuchen wurde Inulin zu Clearancebestimmung benützt, in allen anderen Versuchen Kreatinin.

Tabelle 6. Fortsetzung.

Versuch Nr.	Hund	Wasserbelastung	Ohne Phenolrot (und mit Phenolrot)		
			Harn	Cl	Na
			ccm	Mikro-Mol	
19	Si	200 ccm Wasser 7 Std. vor dem Versuch + 0,74 ccm Wasser/Min. per os und 0,21 ccm physiol. NaCl/Min. i.v.	2,20 (1,30)	100 (54)	— (—)
81 **	Lo.	0,7 ccm 0,6% NaCl/Min. i. v.	2,60 (1,50)	150 (68)	150 (120)
83 **	Wo.	0,7 ccm 0,7% NaCl/Min. i.v.	3,20 (1,20)	350 (180)	290 (210)

** In diesen Versuchen wurde Inulin zu Clearance-Bestimmung benützt in allen anderen Versuchen Kreatinin.

die Sekretion. Der Mittelwert der Phenolrotausscheidung in 22 Versuchen nach Atropin betrug in Prozent der Vorperiode 90%, für die Sekretion 60%. Nur in 5 von 21 Versuchen blieb die Plasmakonzentration des Phenolrots unverändert, in 16 Versuchen stieg sie auf 110—220% an.

Besprechung der Ergebnisse.

Die Versuche haben gezeigt, daß die Ausscheidung von Wasser, Natrium und Chlorid nach verschiedenen Belastungen (intravenös und per os) durch Atropin gehemmt werden kann. Bei gleichzeitiger Wassergabe per os und Infusion bzw. im reinen Wasserstoßversuch hatte Atropin die stärkste beobachtete antidiuretische Wirkung. Daß es sich dabei nicht etwa um eine Hemmung der Wasserresorption durch Spasmus des Pylorus handelte, zeigten die Versuche mit einfachem Wasserstoß, bei denen das Atropin erst eine Stunde nach der Wassergabe injiziert wurde, also nach erfolgter Resorption eines großen Teiles des Wassers. In diesen Versuchen wurde die Harnausscheidung ebenso stark gehemmt wie bei gleichzeitiger Infusion. Die Wasserausscheidung nach Zufuhr per os wird stärker gehemmt als nach intravenöser Infusion. Nach unseren, unten noch näher zu begründenden Anschauungen mußte also auch das per os zugeführte Wasser auf dem Wege der Sekretion ausgeschieden werden. Diese Auffassung stimmt mit den Ergebnissen der Injektionsversuche von Frey[8] überein. Da sich Chlorid gleichsinnig wie Wasser verhält, muß unter bestimmten Bedingungen auch ein Teil des Chlorids sezerniert werden. Beim Wasserstoß wird verhältnismäßig weniger Chlorid als Wasser ausgeschieden, nach Atropin die Chloridausscheidung weniger gehemmt.

[8] Frey, E.: Klin. Wschr. **1937**, 284.

Tabelle 7. *Einfluß einer intravenösen Phenolrotinjektion auf Wasser- und Chloridausscheidung unter den Bedingungen einer Grunddiurese. (Die Zahlen bedeuten Mittelwerte aus 3—4 Sammelperioden.)*

Versuch Nr.	Hund	Vor Phenolrot		Phenolrot*			Nach Phenolrot	
		Ausscheidung je Minute		verabreichte	davon ausgeschieden in 6 Stunden in %	Dauer der Wirkung in Stunden	Ausscheidung je Min.	
		Harn	Chlorid				Harn	Chlorid
		ccm	Mikro-Mol	mg			ccm	Mikro-Mol
6 A	br. Wi.	0,30	10	200	65	$2^1/_2$	0,36	13
7 A	Li.	0,28	58	400	80	2	0,44	41
						1	0,78	123
8 A	w. Wi.	0,24	14	400	70	2	0,39	280
9 A	schw. H.	0,97	51	400	60	2	0,86	79
10 A	Li.	0,36	122	400	70	$^1/_2$	0,58	97

* Das Phenolrot wurde mit der erforderlichen Menge NaOH versetzt und in 10 ccm Wasser gelöst verabreicht.

Die Clearance des Inulins wird in der Mehrzahl der Fälle nicht verändert, hingegen die des zugeführten Kreatinins meistens gesenkt. Dieses verschiedene Verhalten der beiden Testsubstanzen könnte so erklärt werden, daß Kreatinin auch beim Hund nicht unter allen Bedingungen für einen Filtrationstest brauchbar ist; denn die in diesen Versuchen erniedrigte Kreatininclearance muß wohl auf eine Rückresorption des Kreatinins zu beziehen sein. (Das endogene Kreatinin wird, wie wir bereits mitteilten, auch unter noch einfacheren Versuchsverhältnissen rückresorbiert.) Als zweite Möglichkeit bliebe die Erklärung durch eine verminderte Durchblutung des Glomerulus nach Atropin, die zufällig nach Kreatinin öfters beobachtet worden wäre als nach Inulin. Wir möchten eher meinen, daß Kreatinin teilweise rückresorbiert worden ist. Für die im Vergleich zum Inulin größere Neigung zur Rückresorption des Kreatinins sprechen auch Versuche von Richards, Westfall und Bott[9] an uranvergifteten Hunden. Eine Rückresorption auch des Inulins, besonders bei geringer Harnmenge, halten wir nicht für ausgeschlossen (z. B. Versuch 54), denn auch größere Moleküle als das des Inulins, z. B. Hämoglobin, können rückresorbiert werden[10]. Es ist überhaupt fraglich, ob ein idealer Stoff, der nur durch Filtration und ohne Rückresorption unter allen Bedingungen ausgeschieden wird, vorkommt.

Die oben erwähnte Verminderung der Glomerulusdurchblutung durch Atropin wäre entweder eine Wirkung an den Nierengefäßen oder Folge einer allgemeinen Blutdrucksenkung. In einem Blutdruckversuch an

[9] Richards, A. N., B. B. Westfall and P. A. Bott: J. biol. Chem. (Am.) **116**, 749 (1936). — [10] Yuile, C. L.: Physiol. Rev. (Am.) **22**, 19 (1942).

einem Hund von 33 kg bewirkte Atropin in einer Dosis von 150 mg intravenös eine schnell einsetzende Blutdrucksenkung für eine Dauer von 20 Min. Danach war der Blutdruck normal. Das erklärt die niedrigen Harn- und Clearancewerte in der ersten Harnsammelperiode nach Atropin, die deshalb nicht verwertet wurden. Die später beobachteten Atropinwirkungen können also nicht auf allgemeine Blutdruckwirkungen, sondern auf Gefäßverengerung in der Niere selbst oder auf andere Mechanismen zu beziehen sein. Nach RAYMOND-HAMET[11] ist beim Hund keine Blutdruckwirkung nach der kleinen Dosis von 1 mg Atropin je kg intravenös zu beobachten. Da sich das Nierenvolumen in diesen Versuchen nicht änderte, sind wesentliche renale Gefäßwirkungen unwahrscheinlich.

Wegen der Vorteile, welche eine Kaltblüterniere mit den getrennten Gefäßgebieten für Glomerulus und Tubulus bietet, haben wir auch Versuche an Kaltblütern durchführen lassen. Bei Schildkröte[12] und Frosch[13] erzeugte Atropin eine Diureseverminderung bei gleichzeitiger Durchflußverminderung des arteriellen und portalen Kreislaufs. Die Durchflußverminderung des arteriellen Kreislaufs entspricht nicht dem Verhalten der Inulinclearance des Hundes, so daß auch durch diese Befunde eine weitere Aufklärung des Mechanismus der Atropinwirkung nicht möglich ist. Die vom Warmblüter differierende Gefäßwirkung könnte bei der engen Nachbarschaft von Nebenniere und Niere bei diesen Tieren auf eine Adrenalinwirkung zu beziehen sein.

Neben einer Gefäßverengung könnte Atropin auch durch Abdichtung der filtrierenden Membran die Filtration vermindern. Für eine derartige Wirkung sprechen Versuche von LESSER und THIENES[14] sowie GENUIT und JUNKER[15], aus denen eine Abdichtung der Zellmembran nach Atropin hervorgeht. Mag die selbst bei Inulin gelegentlich beobachtete Filtratverminderung nach Atropin nun durch Gefäßverengerung oder Abdichtung zu erklären sein, auf jeden Fall ist sie nicht ausreichend, um die in vielen Fällen stärkere Verminderung der Harnmenge zu erklären. Wir müssen deshalb annehmen, daß die Atropinwirkung auch den Tubulus betrifft. Dabei könnte es sich um eine vermehrte Rückresorption handeln oder Atropin würde in Analogie zu anderen Drüsen bevorzugt auf die sezernierenden Tubuluszellen wirken. Es erhebt sich dabei dieselbe Frage, wie sie auch sonst bei Schwankungen der Diurese entsteht, da eine Änderung der Filtration nur eine Diureseänderung geringen Ausmaßes erzeugen kann. Im Falle des Atropins wäre es gezwungen, die Wirkung auf eine Förderung der Wasserrückresorption zu

[11] RAYMOND-HAMET: C. r. Soc. Biol. **136**, 643 (1942). — [12] HOTOVY, R.: Arch. exp. Path. (D) (im Druck). — [13] TRUNK, GOTTWIK: Diss. Prag. 1944. — [14] LESSER, A. J. and C. H. THIENES: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **45**, 109 (1940). — [15] GENUIT, H. u. A. JUNKER: Arch. exp. Arch. (D) **202**, 97 (1943).

beziehen, da Atropin an anderen Zellen mit ähnlicher Funktion hemmend wirkt. Eine Möglichkeit bestünde in der Einwirkung auf den Papillarmuskel, durch dessen Kontraktion nach den Untersuchungen von Averbeck, Meitner und Schneider[16] eine Harnverminderung durch Rückstauung auch unabhängig von der Durchblutung erzeugt werden kann. Dabei muß man erwarten, daß durch die Rückstauung die Filtration abnimmt. Nach Atropin wird aber bei Verwendung des Inulins als Test durchaus nicht in allen Fällen die Filtration gleichzeitig mit der Harnmenge vermindert. Da es durch Papillarmuskelkontraktion zur Anurie kommen kann, mußte man eine solche auch auf der Höhe der Atropinwirkung erwarten. Dies ist aber nicht der Fall. Es ist nach allem daher wahrscheinlich, daß Atropin spezifisch hemmend auf das sezernierende Epithel wirkt. Sicher nachgewiesen wurde von uns eine Sekretionshemmung für Phenolrot, das in niedrigen Plasmakonzentrationen in beträchtlichem Ausmaß sezerniert wird. Diese Hemmung findet auch ihren Ausdruck in dem mitunter beträchtlichen Anstieg der Plasmakonzentration nach Atropin. Ferner haben wir nachgewiesen, daß gleichzeitig mit Phenolrot Wasser vermehrt ausgeschieden wird, welches offenbar mitsezerniert wurde. Wenn auch das Ausmaß dieser Wasserausscheidung nicht sehr groß ist, so ist dies vielleicht dadurch begründet, daß das sezernierte Wasser zum Teil wieder rückresorbiert wird, so daß die wahre Sekretion nicht faßbar ist. Nach Atropin wird außer der Phenolrotsekretion auch die Wasserausscheidung bzw. Sekretion gehemmt.

Es ist wahrscheinlich, daß unter solchen Voraussetzungen auch die oben geschilderte Atropinwirkung auf das Epithel nicht auf eine vermehrte Rückresorption, sondern in analoger Weise auf eine Verminderung einer vorher vorhandenen Sekretion zu beziehen ist. Dabei ist nicht zu entscheiden, ob es sich um eine zentrale oder periphere Atropinwirkung handelt. Die gleichgerichtete Wirkung auch kleiner Dosen (5 mg: Tabelle 4 und 5, Versuch 8 und 13) spricht für einen peripheren Angriffspunkt. Die Unabhängigkeit der Diuresewirkung des Atropins vom Zustandsbild des Zentralnervensystems (Erregung oder Narkose) spricht gegen einen zentralen Angriffspunkt.

Wenn, wie aus dem Nachweis der Phenolrot- (und Wasser-) Sekretion hervorgeht, ein Sekretionsmechanismus in der Niere besteht, so wird dieser nicht nur für die Ausscheidung körperfremder, sondern erst recht körpereigener Substanzen zur Verfügung stehen. Während eine Sekretion für körperfremde, in niedriger Konzentration leicht faßbare Substanzen nachgewiesen wurde, fehlt aus Mangel an analytischen Methoden der Einblick in die Ausscheidungsverhältnisse körpereigener

[16] Averbeck, G., H. J. Meitner u. M. Schneider: Z. exper. Med. **111**, 436 (1942).

Stoffe, weshalb in den herrschenden Anschauungen über die Harnbildung die Sekretion dieser Substanzen keine Beachtung findet. Unsere Versuche machen es wahrscheinlich, daß an der Harnbildung auch physiologischerweise eine Sekretion im Tubulusapparat beteiligt ist und daß unter pathologischen Verhältnissen dieser Mechanismus eine gestörte Glomerulusfunktion zu kompensieren vermag und daß ferner eine Belastung dieses Apparates zu einer Erschöpfung seiner Kapazität führen kann (Kochsalzdiät, Rest-N). Vermutlich ist ein großer Teil der Wirkungen von Diuretika auf eine gesteigerte Sekretion zu beziehen. Durch die Verwendung von Atropin als sekretionshemmende Substanz erscheint es möglich, eine Gruppierung der Diuretika vorzunehmen in solche, die auf dem Wege gesteigerter Sekretion und in solche, die durch vermehrte Rückresorption wirken.

Zusammenfassung.

1. Atropin hemmt beim Hund die Wasser-, Chlorid- und Natriumausscheidung unter verschiedenen Belastungen, besonders stark nach Wasser per os.

2. Die Clearance des Inulins wird in der Mehrzahl der Fälle nicht verändert, die des zugeführten Kreatinins meistens gesenkt. Kreatinin ist auch beim Hund nicht unter allen Bedingungen als Filtrationstestsubstanz brauchbar.

3. Auch die Phenolrotsekretion wird durch Atropin gehemmt.

4. Phenolrotzufuhr führt bei geeigneten Bedingungen zu vermehrter Wasserausscheidung (Sekretion), die gleichfalls durch Atropin gehemmt wird.

5. Die Versuche zeigen, daß normale Harnbestandteile durch die Tubuluszellen auf dem Wege der Sekretion ausgeschieden werden und machen es wahrscheinlich, daß dieser Mechanismus unter pathologischen Verhältnissen kompensierend eingreift. Es besteht die Aussicht, durch Atropin den Anteil der Sekretion an Wirkungen von Diuretika zu erfassen.

Aus dem Pharmakologisch-Pharmakognostischen Institut der früheren Deutschen Karls-Universität in Prag (Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky).

Diurese, Filtration und Sekretion der Niere unter dem Einfluß verschiedener Pharmaka.

IV. Mitteilung.

Einfluß des Atropins auf Wasser- und Chloridausscheidung der Ratte bei verschiedenen Belastungen.

Von

H. Langecker und G. Kuschinsky.

(Eingegangen am 24. Oktober 1944.)

Früher haben wir am Hund unter verschiedenen Belastungen den Nachweis einer Diuresehemmung durch Atropin erbracht[1], die durch eine Hemmung der Sekretion der Tubuluszellen erklärt wurde. Da unter den Laboratoriumstieren neben dem Hund die Ratte für Diureseversuche bevorzugt wird, schien es wünschenswert, das Verhalten der Rattendiurese nach Atropin zu untersuchen. Angaben über Atropinwirkungen auf die Diurese in der Literatur siehe die frühere Arbeit[1]. Versuche an Ratten liegen nicht vor. Wir haben deshalb bei Ratten unter Belastungen mit Wasser per os bzw. parenteral, sowie Kochsalzlösungen verschiedener Konzentration parenteral die Diurese mit und ohne Atropin verglichen.

Methodik.

Männliche Ratten im Gewicht von 110—380 g wurden, um die Fütterungsbedingungen gleichmäßig zu halten, in einem großen Käfig gemeinsam gehalten. Für jeden Versuch wurden 32 Tiere, davon 16 als Kontrollen in Gruppen zu je 4 in Diuresekäfige untergebracht und stündlich die Harnmenge gemessen. Die merkurimetrische Chloridbestimmung[2] wurde im Harn der ersten 4 Stunden durchgeführt. Wir haben mit Rücksicht auf die Unempfindlichkeit der Ratten sehr große Atropindosen verwendet; bis auf die Versuche mit Wasserbelastung per os haben wir 10 mg je 100 g Ratte Atropin. sulfuric. in der Belastungslösung gelöst gegeben. Diese Dosen wurden von den Tieren noch vertragen.

Versuchsergebnisse.

Auch an der Ratte bewirkt Atropin eine Hemmung der Wasser- und Chloridausscheidung unter geeigneten Bedingungen (s. Tabelle). Im einzelnen waren die Ergebnisse folgende:

Wasserbelastung per os (Versuch 1—2): In 2 Versuchen war nach Wasserbelastung per os und 30 bzw. 50 mg Atropin subkutan die Diurese

[1] Kuschinsky, G. u. H. Langecker: Arch. exp. Path. (D.) **204**, 718. — [2] Kuschinsky, G. u. H. Langecker: Biochem. Z. im Druck.

Tabelle 1. *Einfluß des Atropins auf Wasser- und Chloridausscheidung der Ratte bei verschiedenen Belastungen.*

(Die Zahlen bedeuten Mittelwerte der Ausscheidung von 16 Tieren.)

Atropin wurde mit Ausnahme von Versuch 1 und 2 jeweils in der zur Belastung dienenden Flüssigkeit gelöst. Zahlen der Atropinversuche in Klammern.

Versuch-Nr.	Belastung je 100 g Ratte	Ausscheidung je 100 g Ratte		
		Harn ccm		Cl mg
		nach		
		4 Std.	6 Std.	4 Std.
1	5 ccm H_2O per os	2,67	2,86	—
	(+ 50 mg Atropin in 1 ccm phys. Kochsalzlösung subkutan)	(0,61)	(1,03)	(—)
2	5 ccm H_2O per os	2,77	3,09	2,79*
	(+ 30 mg Atropin in 1 ccm phys. Kochsalzlösung subkutan)	(0,97)	(1,27)	(1,37)
3	3 ccm H_2O subkutan	1,59	2,09	0,50
	(+ 10 mg Atropin)	(1,44)	(1,76)	(0,92)
4	3 ccm H_2O subkutan	1,65	2,17	0,72
	(+ 10 mg Atrpoin)	(0,98)	(1,17)	(0,99)
5	5 ccm H_2O subkutan	2,53	2,78	0,98
	(+ 10 mg Atropin)	(1,44)	(1,68)	(0,78)
6	5 ccm H_2O subkutan	2,75	3,03	1,19
	(+ 10 mg Atropin)	(1,83)	(2,30)	(0,51)
7	3 ccm 0,2% NaCl subkutan	1,90	2,15	2,04
	(+ 10 mg Atropin)	(1,30)	(1,52)	(0,59)
8	3 ccm 0,2% NaCl subkutan	1,87	2,09	1,07
	(+ 10 mg Atropin)	(0,99)	(1,18)	(0,50)
9	3 ccm 0,2% NaCl subkutan	0,94	1,12	0,81
	(+ 5 mg Atropin)	(0,80)	(0,92)	(0,74)
10	3 ccm 0,2% NaCl subkutan	1,28	1,74	1,91
	(+ 5 mg Atropin)	(1,51)	(1,64)	(1,00
11	3 ccm 0,6% NaCl subkutan	1,47	2,61	3,43
	(+ 10 mg Atropin)	(1,04)	(1,44)	(1,63)
12	3 ccm 0,6% NaCl subkutan	0,545	1,25	1,74
	(+ 10 mg Atropin)	(0,37)	(0,45)	(0,48)
13	2,5 ccm H_2O i.p. + 0,1 ccm 0,6% NaCl subkutan	0,38	0,55	0,59
	(+ 10 mg Atropin in 0,1 ccm 0,6% NaCl)	(0,96)	(1,11)	(0,34)
14	2,5 ccm H_2O i.p. + 0,1 ccm 0,6% NaCl subkutan	2,16	2,53	0,51
	(+ 10 mg Atropin in 0,1 ccm 0,6% NaCl)	(2,38)	(2,75)	(0,59)
15	5,0 ccm H_2O i.p. + 0,1 ccm 0,6% NaCl subkutan	3,97	4,78	4,21
	(+ 10 mg Atropin in 0,1 ccm 0,6% NaCl)	(3,12)	(3,93)	(2,82)
16	5,0 ccm H_2O i.p. + 2,5 ccm 0,6% NaCl subkutan	5,11	6,53	5,85
	(+ 10 mg Atropin in 2,5 ccm 0,6% NaCl)	(4,65)	(5,55)	(2,49)

Tabelle 1. (Fortsetzung).

Versuch-Nr.	Belastung je 100 g Ratte	Ausscheidung je 100 g Ratte		
		Harn ccm		Cl mg
		nach		
		4 Std.	6 Std.	4 Std.
17	10 ccm H_2O i.p. + 1 ccm 0,6% NaCl subkutan	4,62	5,60	3,42*
	(+ 10 mg Atropin in 1 ccm 0,6 % NaCl)	(4,64)	(5,28)	(3,41)
18	2,5 ccm 0,6% NaCl i.p.	1,73	2,08	12,42
	(+ 10 mg Atropin)	(0,6)	(0,79)	(2,87)
19	5 ccm 0,6% NaCl i.p.	3,92	5,25	19,52
	(+ 10 mg Atropin)	(1,98)	(3,33)	(7,46)
20	5 ccm 0,6% NaCl i.p.	2,34	3,32	8,15
	(+ 10 mg Atropin)	(1,49)	(2,57)	(3,98)
21	10 ccm 0,6% NaCl i.p.	4,98	7,195	13,61
	(+ 10 mg Atropin)	(4,295)	(5,56)	(9,55)
22†	0,1 ccm 0,6% NaCl subkutan	0,06	0,30	1,62
	(+ 10 mg Atropin in 0,1 ccm 0,6% NaCl)	(0,19)	(0,50)	(1,99)

* 6 Stunden.

† Am Vortage erhielten Haupt- und Kontrollgruppe 4 ccm H_2O per os: Ausscheidung je Stunde/100 g Harn 0,28 bzw. 0,20; Chlorid 1,53 bzw. 1,06.

etwa auf ein Drittel gehemmt und die Chloridausscheidung in einem Versuch auf die Hälfte herabgesetzt.

Wasserbelastung i.p. (Versuch 13—17): Die Diurese ist nicht durch Atropin gehemmt. In 2 von 5 Versuchen ist die Chloridausscheidung deutlich herabgesetzt.

Wasserbelastung subkutan (Versuch 3—6): Die Wasserausscheidung ist nach Atropin in 3 von 4 Ver uchen stark, in einem wenig gehemmt, die Chloridausscheidung ist nur in einem deutlich, in einem anderen wenig gehemmt, in 2 Versuchen sogar gesteigert.

Belastung mit 0,2%iger NaCl-Lösung subkutan (Versuch 7—10): In 2 von 4 Versuchen war die Wasserausscheidung stark, in zwei weiteren weniger gehemmt. Die Chloridausscheidung war in 3 von 4 Versuchen deutlich gehemmt.

Belastung mit 0,6%iger NaCl-Lösung subkutan bzw. i.p. (Versuch 11—12 bzw. 18—21): In allen Versuchen war die Diurese zum Teil beträchtlich gehemmt, die Chloridausscheidung war noch stärker betroffen.

Belastung mit Wasser am Vortage (Versuch 22): In einem Versuch nach der von Haas[3] angegebenen Art der Belastung war keine Atropinwirkung auf die Wasser- und Chloridausscheidung festzustellen.

[3] Haas, H. T. A.: Arch. exp. Path. (D) 201, 589 (1943).

Besprechung der Ergebnisse.

Die früher am Hund beobachteten Atropinwirkungen auf Wasser- und Chloridausscheidung lassen sich auch an der Ratte bestätigen. Das Ausmaß der Wirkung ist von der Belastung bestimmt. Parenterale Belastung mit 0,6%iger Kochsalzlösung gibt bessere Bedingungen als 0,2%ige oder Wasser. Dies spricht für die Bedeutung des Kochsalzes für den Mechanismus der Diuresehemmung in ähnlicher Weise wie die gelegentlich beobachtete stärkere Beeinflussung des Chlorids gegenüber dem Wasser (s. Versuch 10, 13, 16). Auch ohne Kochsalzbelastung läßt sich nach Wasser per os eine starke Hemmung der Wasser- und Chloridausscheidung erzeugen. Allerdings kann gegen diese Versuchsergebnisse der Einwand erhoben werden, daß sie auf einer Hemmung der enteralen Wasserresorption beruhen. Das Ausbleiben der Atropinwirkung nach Wasserbelastung am Vortag (Versuch 22) ist vielleicht in Parallele zu setzen zu den negativen Ergebnissen nach intraperitonealer Wassergabe. Die Befunde scheinen das Gegenstück zu bilden zu den Versuchen nach Kochsalzbelastung. Die Atropinwirkung auf Wasser- und Chloridausscheidung ist bei Ratte und Hund gleichartig.

Zusammenfassung.

1. Atropin hemmt bei der Ratte die Wasser- und Chloridausscheidung.
2. An diesem Mechanismus ist das Kochsalz wesentlich beteiligt.

Aus dem Pharmakologisch-Pharmakognostischen Institut der früheren Deutschen Karls-Universität in Prag. (Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky).

Diurese, Filtration und Sekretion der Niere unter dem Einfluß verschiedener Pharmaka.

V. Mitteilung.

Die diuretische Wirkung organischer Quecksilberverbindungen bei Hund, Ratte und Maus unter dem Einfluß des Atropins.

Von

H. Langecker und G. Kuschinsky.

(Eingegangen am 15. Februar 1945.)

Nach den Ergebnissen unserer früheren Arbeit[1], in der wir die hemmende Wirkung des Atropins auf die Sekretion der Tubuluszellen nachweisen konnten, erschien der Versuch aussichtsreich mit Hilfe des Atropins eine Beteiligung der Sekretion an der Wirkung der Diuretika zu erfassen und damit unter ihnen eine neue Gruppierung zu ermöglichen. Bei der Quecksilberdiurese (Novasurol) haben Saxl und Heilig[2] am Menschen eine Hemmung durch Atropin beobachtet. Allerdings sind diese Ergebnisse nicht sehr überzeugend. Troise[3] fand am Hund die Novasurolwirkung durch kleine Dosen Atropin nicht beeinflußt. Nach Melville und Stehle[4] wirkt Atropin in kleinen Dosen beim Hund auf die Novasuroldiurese nicht hemmend. Da wir in den früheren Versuchen den hemmenden Effekt des Atropins an der Wasserdiurese mit großen Dosen erzielt hatten, war es nötig, die Wirkung *großer* Atropindosen auf die Quecksilberdiurese festzustellen. Wegen des früher von uns beschriebenen ungleichmäßigen Diureseverlaufes bei intravenöser Infusion bzw. Wasserbelastung per os[5] arbeiteten wir an Hunden unter den Verhältnissen der Grunddiurese, d. h. an Tieren, die 16 Stunden vor Versuchsbeginn gefüttert waren und denen nach der Fütterung das Trinkwasser entzogen war. Da ferner die Wasserdiurese selbst durch Atropin hemmbar ist, kann man die Unterdrückung des diuretischen Effektes einer Substanz unter den Bedingungen des Wasserstoßes nicht eindeutig

---

[1] Kuschinski, G. u. H. Langecker: Arch. exper. Path. (D.) **204**, 718. — [2] Saxl, P. u. H. Heilig: Wien. klin. Wschr. **1920**, 943. — Wien. Arch. inn. Med. **3**, 151 (1922). — [3] Troise, E.: Sem. méd. (Arg.) **41**, 630 (1934). — [4] Melville, K. I. u. R. L. Stehle: Arch. exper. Path. (D.) **123**, 175 (1927). — [5] Kuschinsky, G. u. H. Langecker: Arch. exper. Path. (D.) **204**, 699, 710.

beurteilen. Schließlich ist die pharakologischem Wirkung einer Substanz auf die Diurese nicht genügend charakterisiert, wenn man sie nur in Beziehung zur Wasserbelastung betrachtet, z. B. wirkt Hypophysenhinterlappenhormon nach FROMHERZ[6], sowie nach UNNA und WALTERSKIRCHEN[7] bei Grunddiurese diuresefördernd, bei Wasserstoß hemmend.

Methodik.

Da an verschiedenen Tagen auch an demselben Hund eine verschieden hohe Änderung der Wasser- und Chloridausscheidung nach dem Quecksilberdiuretikum auftritt, ähnlich wie früher für den Wasserstoß beschrieben [1, 5], haben wir an demselben Tier mehrere Salyrganversuche mit Atropin durchgeführt und zum Vergleich Salyrganversuche ohne Atropin mit entsprechender Wasser- und Chloridausscheidung in der Vorperiode gegenübergestellt. Das Atropin wurde eine halbe, in einem Fall 1 Stunde nach dem Salyrgan injiziert, also noch in der Latenzzeit der Salyrganwirkung. Diese wurde 6 Stunden beobachtet. Wir verwendeten zur intravenösen Injektion die Verdünnung einer theophyllinfreien 20%-Lösung von Salyrgan* in Dosen von 1,25—8 mg/kg. Der endgültige Vergleich wurde mit gut wirksamen, aber schwellennahen Dosen durchgeführt, um dem Einwand zu begegnen, daß die Atropinwirkung durch allzu große Salyrgandosen überdeckt würde. Da nach unseren Erfahrungen die hemmende Atropinwirkung bei der Wasserdiurese nach etwa 3 Stunden abklingt, haben wir in einem Teil der Versuche 3 Stunden nach der ersten eine zweite Atropindosis gleicher Höhe verabreicht um auch den Antagonismus in dieser Phase der Salyrgandiurese zu prüfen.

In vielen Versuchen der neueren Zeit werden organische Quecksilberverbindungen mit Theophyllin kombiniert gegeben, so daß Unterschiede im Wirkungsmechanismus dieser beiden Gruppen nicht festgestellt werden können. In der experimentellen Literatur fehlt eine Untersuchung über diese Kombination, obgleich die als Arzneimittel verwendeten Präparate zum größten Teil derartige Kombinationen enthalten.

Sonstige methodische Einzelheiten siehe frühere Arbeiten [1, 5].

Ergebnisse der Versuche am Hund.

Der Verlauf der einzelnen Versuche ist in Tabelle 1 dargestellt. Dabei wurden der besseren Übersicht halber jeweils Sammelperioden von annähernd gleich großem Ausscheidungsausmaß zusammengefaßt. Dadurch wurde eine kurvenähnliche Darstellung der Ausscheidung gewonnen und gleichzeitig ein Vergleich der ersten mit der zweiten 3-Stunden-Phase der Salyrganwirkung ermöglicht. In Tabelle 2 wurden vergleichbare Salyrganversuche mit und ohne Atropin gegenübergestellt, und zwar getrennt nach erster und zweiter 3-Stunden-Phase. Zu diesem Zwecke wurden an demselben Tier mehrere Salyrganversuche unter

---

[6] FROMHERZ, K.: Arch. exper. Path. (D.) **100**, 1 (1923). — [7] UNNA, K. u. L. WALTERSKIRCHEN: Arch. exper. Path. (D.) **178**, 639 (1935); **181**, 681 (1936).

* Das Präparat wurde uns in dankenswerter Weise von der Firma *Bayer* zur Verfügung gestellt.

Atropin durchgeführt und mit Kontrollversuchen entsprechender Ausgangsbedingungen in Bezug auf Wasser- und Chloridausscheidung verglichen.

Die Salyrganempfindlichkeit der Hunde schwankte. Die Schwelle lag bei den verwendeten 4 Hunden im Gewicht von 7—18 kg bei 1,5—6 mg/kg intravenös. Die Wasserausscheidung wurde auf das 1,3 bis 8fache vermehrt, die Chloridausscheidung meistens in ähnlichem Ausmaß, mitunter aber wesentlich stärker. Die Dauer der Wirkung betrug bei diesen Schwellendosen in 18 Versuchen 1—3 Stunden, in 3 Versuchen mindestens 6 Stunden. Die Wirkung trat sofort oder nach einer Latenz von $^1/_2$ bis 1 Stunde ein. Chlorid- und Wasserausscheidung klangen meistens zur gleichen Zeit ab. In manchen Fällen hielt die Wirkung auf die Ausscheidung des Wassers, in anderen des Chlorids länger an. Mit Einsetzen der Salyrgandiurese war der Harn regelmäßig heller gefärbt, als nach dem Verdünnungsgrade zu erwarten war. Eine Eiweißausscheidung wurde nicht beobachtet. Die Ausscheidung des endogenen Kreatinins zeigte nach Salyrgan nur gelegentliche und unbeträchtliche Zunahmen (20—30%), so daß eine Beteiligung der Filtration an der Salyrgandiurese nicht anzunehmen ist, soweit das endogene Kreatinin als Filtrations-Testsubstanz überhaupt verwendbar ist[8].

Nach Atropin war die Intensität der Salyrganwirkung in 15 von 16 Versuchen auf die Wasserausscheidung unvermindert oder sogar beträchtlich gesteigert, wenn man von der Kreislaufwirkung des Atropins in der ersten halben Stunde absieht. Die Dauer der Salyrganwirkung war nach Atropin in 9 von 16 Versuchen auch beträchtlich verlängert, in den übrigen nicht vermindert (s. Tabelle 1 und 2). Chlorid verhielt sich gleichsinnig wie Wasser; gelegentlich wurde es sogar wesentlich stärker nach Atropin ausgeschieden. Nur in einem von 12 Versuchen war die Salyrganwirkung auf die Chloridausscheidung durch Atropin unterdrückt. Da in 4 von 7 Versuchen die Salyrganwirkung nach Atropin in der zweiten 3-Stunden-Phase wesentlich stärker war als im Vergleichsversuch, wurde in den folgenden Versuchen nach 3 Stunden die Atropininjektion wiederholt, um den Einwand zu begegnen, daß die Atropinwirkung der zweiten 3-Stunden-Phase einem Abklingen der Atropinwirkung entspräche. Daß dies nicht der Fall ist geht daraus hervor, daß kein Unterschied zwischen einmaliger und zweimaliger Atropinzufuhr zu beobachten war.

In einer größeren Zahl von Versuchen zeigte sich, daß Atropin bei Hunden unter den Bedingungen der Grunddiurese eine starke fördernde Wirkung auf die Wasser- und Chlorid-Ausscheidung hat*.

[8] Kuschinsky, G. u. H. Langecker: Arch. exper. Path. (D.) (im Druck).

* Die Protokolle dieser Versuche sind durch die Zeitumstände verloren gegangen.

Tabelle 1.

Wirkung des Atropins auf die Ausscheidung von Wasser und Chlorid nach Salyrgan beim Hund.

Hund	Ohne Atropin															
	Vers. Nr.	Salyrgan mg/kg	Vorperiode[1] vor Salyrgan		nach Salyrgan											
			Ausscheidung je Min.		Beobachtungs-Dauer[2] in Halbstunden				Werte in % der Vorperiode							
									Harn				Cl			
			Harn ccm	Chlorid Mikromo												
Fo. 7 kg	1	6,0	0,37	20	1	4	8		150	330	40		200	1100	300	
	3	6,0	0,13	44	4	1	3	2	900	360	150	90	600	100	100	30
	5	3,0	0,09 ?	22 ?	5				540				550			
	7	1,5	0,14	43	4	5			230	50			230	30		
	9	1,5	0,13	9	4	2	4		150	90	240		100	90	300	
br.Fr. 9,5 kg **	12	1,25	0,36	8	5				140				600			
	13	2,0	0,21	80	4				400				300			
	14	1,8	0,079	5,9	4				130				130			
	15	1,8	0,08	15	3	1	6		750	250	150		1200	300	40	
	18	1,6	0,09	4,5	5	4			140	120			120	120		
	21	1,6	0,1	15	2	4	4		120	170	130		130	300	130	
Li. 18,5 kg	1	2,0	0,56 ?	64 ?	2				130				80			
	2	2,0	0,46	58	2				200				130			
	3	4,0	0,25	22	4	2	2		250	100	90		600	500	170	
	5	4,0	0,64	84	1	2	4	4	70	200	90	80	50	340	130	80
	7	8,0	0,7	64	1	3	1	4	90	400	110	30	90	700	130	80
	9	6,0	0,63	115	1	4	4		70	280	50		50	200	40	
Fu. 6,5 kg	2	6,0	0,089	1,5	3	5	2		500	160	600		800	400	1900	
	6	6,0	0,16	22	1	2	2	3	100	500	100	50	100	700	300	30
	8	6,0	0,2	28	1	3	1	1	100	540	120	60	140	800	140	50

Tabelle 1. (Fortsetzung.)

Hund	Mit Atropin																						
	Vers. Nr.	Salyrgan mg/kg	Atropin i. v. mg		Vorperiode[1] vor Salyrgan		nach Salyrgan																
					Ausscheidung je Min.		Beobachtungs-Dauer[2] in Halbstunden					Werte in % der Vorperiode											
					Harn ccm	Chlorid Mikromol						Harn						Cl					
Fo. 7 kg	2	6,0	80		0,25	87	4	4				600	90										
	4	6,0	80		0,33	32?	4	1	1	1		530	200	110	30			900	400	180	16		
	6	3,0	80		0,35	11	4	4				200	260					1000	400				
	8	1,5	80		0,094	2,5	5	4				540	500					2000	1300				
	10	1,5	80		0,09	1,3	5	4				450	800					400	2000				
	11	1,5	80		0,17	8,5	5	4				200	180					500	330				
br. Fr. 9,5 kg **	19	1,6	80	80	0,066	3	2	4	4	1		150	360	300	800			150	2000	600	800		
	16	1,8	80		0,17	12	1	2	3	4		90	290	240	600			400	1900	270	400		
	17	1,8	80		0,12	5	3	2	3			140	240	500				280	800	1600			
	22	1,5	80	80	0,11	19	6	1	3			200	170	200				340	200	240			
Li. 18,5 kg	4	4,0	100	100	0,39	120	3	5	2			400	70	140				400	24	18			
	6	4,0	100	100	0,59	74	1	2	2	2	2	66	100	70	80	100		40	200	100	66	100	
	8	8,0	150	150	0,7	88	1	3	1	2	4	80	340	120	80	65		50	500	200	100	25	
	10	6,0	150	150	1,02	128	1	3	2	1	3	50	160	75	17	55		50	300	120	15	25	
Fu. 6,5 kg	3	6,0	80	80	0,14	15	1	3	2	4		90	600	90	100			150	1400	70	24		
	5	6,0	75	75	0,12	3,3	1	3	2	3	2	700	400	300	240	750		4000	2000	2000	400	500	
	10	6,0	80	80	0,17	3,4	1	1	3	2	2	1	600	130	250	170	300	140	400	1000	1600	600	1200	300

[1] Werte der Vorperiode sind Mittelwerte aus 3—4 halb- bis 1stündigen Sammelperioden.

[2] Halbstundenperioden von annähernd gleich großen Ausscheidungsausmaßen wurden jeweils zusammengefaßt. Die zugehörigen Werte stehen an den einander entsprechenden Stellen der Tabelle.

* Die erste und zweite 3-Stunden-Phase ist bei 2 Atropininjektionen durch einen senkrechten Strich getrennt.

** Der Hund erhielt die doppelte Kochsalzzulage.

Tabelle 2. *Vergleich der Wirkung des Salyrgans mit und ohne Atropin unter Zugrundelegung gleicher Wasser- bzw. Chloridausscheidung in der Vorperiode.*

Hund	Vers. Nr.	Salyrgan mg/kg	Atropin mg	Ausscheidung je Min. in der Vorperiode		Harnausscheidung			Chloridausscheidung		
						in % der Vorperiode		Verhältnis des Salyrgan-Effektes	in % der Vorperiode		Verhältnis des Salyrgan-Effektes
				Harn ccm	Chlorid Mikromol	mit Atropin *	ohne Atropin	mit u. ohne Atropin	mit Atropin *	ohne Atropin *	mit u. ohne Atropin
Fo.	2	6,0	80	0,25	87	620 90	330—900 40—150	100 100	380 50	fehlt fehlt	fehlt fehlt
	4	6,0	80	0,33	32	530 110	330 40	160 270	900 180	600 100	150 180
	8	1,5	80	0,094	2,5	540 500	150 240	360 200	2000 1300	fehlt fehlt	fehlt fehlt
	10	1,5	80	0,09	1,3	450 800	150 240	300 330	4000 2000	fehlt fehlt	fehlt fehlt
	11	1,5	80	0,17	8,5	200 180	230 50	90 360	500 330	100 300	500 110
br. F.	16	1,8	80	0,17	12	290 600	140 130	200 450	1900 400	1200—300 130	250 300
	17	1,8	80	0,12	5	240 500	170 130	140 400	500 1600	120 120	400 1300
	19	1,6	80 80	0,066	3	360 300	750 150	50 200	2000 600	1200 120	1700 500
	22	1,5	80 80	0,11	19	200 200	170 130	120 140	340 240	1200 40	30 600
Li.	4	4	100 100	0,39	120	400 140	250 160	160 90	400 18	fehlt fehlt	fehlt fehlt
	6	4	100 100	0,59	74	100 100	200 80	50 120	200 100	340 80	60 120
	8	8	150 150	0,7	88	340 65	400 30	80 200	500 25	700 80	70 30
	10	6	150	1,0	128	160 55	fehlt fehlt	fehlt fehlt	300 25	200 40	150 60
Fu.	3	6	80 80	0,14	15	600 100	500 50	120 200	1400 24	700 30	200 80
	4	6	75 75	0,12	3,3	400 750	500 50	80 1500	2000 2000	800 1900	250 100
	10	6	80 80	0,17	3,4	600 300	500 50	120 600	1600 1200	800 1900	200 70

* Die hier angegebenen 2 Werte wurden aus der ersten bzw. zweiten 3-Stunden-Phase ausgewählt.

Ergebnisse der Versuche an Ratte und Maus.

In 10 Versuchen an je 32 männlichen erwachsenen *Ratten*, von denen die Hälfte mit theophyllinfreiem Salyrgan subkutan und intraperitoneal in Dosen von 0,03—0,5 mg je 100 g behandelt waren, konnten wir keinen Effekt auf Wasser- und Chloridausscheidung erzielen. In wenigen Fällen war eine geringe Vermehrung der Chloridausscheidung zu beobachten, die nicht über das Doppelte hinausging. Die Versuchs- und Kontrolltiere wurden dabei verschiedenen Belastungen unterworfen. Sie erhielten Wasser oder 0,2—0,9% Kochsalzlösung subkutan, sowie 0,2 oder 0,6% Kochsalzlösung intraperitoneal. In weiteren 14 Versuchen an je 32 Ratten, von denen die Hälfte mit theophyllinfreiem Novurit (40,7% Hg) subkutan und intraperitoneal in Dosen von 1 bis 10 mg/100 g behandelt waren, konnte kein Effekt auf Wasser- und Chloridausscheidung beobachtet werden, mitunter sogar eine Hemmung. Nur in einem Versuch war die Chloridausscheidung vermehrt. Die Versuchs- und Kontrolltiere wurden dabei teils nicht belastet, teils verschiedenen Belastungen wie in den Salyrganversuchen, sowie mit Wasser per os unterworfen. Auch 14tägige Salz- bzw. Fleischzulagen zum Futter änderten nichts an den Ergebnissen.

In 4 Versuchen an je *48 Mäusen*, von denen die Hälfte mit Novurit subkutan und intraperitoneal in Dosen von 1—5 mg/100 g behandelt waren, konnte, abgesehen von einer geringen Zunahme der Chloridausscheidung, kein Effekt erzielt werden. Die Versuchs- und Kontrolltiere wurden dabei mit 0,2% Kochsalzlösung subkutan und intraperitoneal und mit 1,2% Kochsalzlösung intraperitoneal belastet. In einem Toxizitätsversuch sind mit 12 mg Novurit je 100 g die Tiere nach 7 Tagen gestorben. Es war daher nicht möglich, an Ratte und Maus den Atropinantagonismus zu prüfen.

Besprechung der Ergebnisse.

Die Versuche am Hund haben eindeutig ergeben, daß selbst große Dosen Atropin nicht imstande sind, die durch Salyrgan gesteigerte Ausscheidung von Wasser und Chlorid zu hemmen, sondern daß Atropin sogar in einer großen Zahl der Fälle eine zum Teil beträchtliche Vermehrung der Wasser- und in noch größerem Maße der Chloridausscheidung verursacht. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu den früher bei der Wasserbelastung gewonnenen. Es zeigt sich also, daß große Dosen Atropin nicht jede Art von vermehrter Wasser- und Chloridausscheidung unterdrücken können.

Da die hemmende Atropinwirkung auf die Wasserdiurese bei der Ratte gut darzustellen war[9], haben wir das Verhalten des Atropins

[9] Langecker, H. u. G. Kuschinsky: Arch. exper. Path. (D.). **204**, 740 (1947).

gegenüber theophyllinfreien organischen Hg-Verbindungen an Ratte und Maus geprüft. Es ist uns aber nicht möglich gewesen, an beiden Tierarten ohne oder mit verschiedenen Belastungen eine Diurese zu erzeugen. Auch Bonsmann und Müller-Neff[10] konnten an der Maus nur eine Erhöhung der Diurese auf das Doppelte mit sehr hohen Dosen Salyrgan erzielen. An der Ratte hatte Marx[11] mit sehr großen Dosen Esidron, das allerdings gleichzeitig der Purinreihe angehört, nach Wasserstoß eine Diuresewirkung erhalten. Auch bei den diuretischen Wirkungen an Ratten, welche Szabó[12] nach großen Dosen Novurit erhielt, ist mit einer Theophyllinwirkung zu rechnen. — Nach diesen Ergebnissen müssen wir annehmen, daß Ratte und Maus unter den angegebenen Bedingungen nicht auf organische Hg-Verbindungen ansprechen. Bei der von Claussen[13] beobachteten Beziehung des Salyrgans zur Leberfunktion und einer in der Galle ausgeschiedenen diuretischen Substanz einerseits und der von Fromherz[14] für die cholagoge Wirkung der Gallensäuren und von Hotovy[15] in bezug auf die Diurese nach Gallensäuren nachgewiesenen Sonderstellung der Ratte andererseits ist daran zu denken, daß die Ratte und auch die Maus auf Grund einer anderen Leberfunktion in mancher Beziehung eine Sonderstellung im Wasserhaushalt einnimmt. Bei der Beliebtheit der Ratte als Diuresetier sind diese Befunde zu beachten.

Ferner ist bei der Verwendung von wasserbelasteten Tieren für die Prüfung von Diuresehemmungen zu bedenken, daß Diurese durch Wasserstoß und durch andere Belastung oder ohne Belastung völlig verschiedene Ausgangsbedingungen darstellen.

Da nach unserer Auffassung Atropin am sezernierenden Tubulusapparat angreift, kann die Salyrgandiurese nicht auf dem Wege einer vermehrten Sekretion zustandekommen. Da die außerordentlich starke Vermehrung der Ausscheidung nicht auf einer Vermehrung der Filtration beruhen kann, was auch durch Experimente anderer Autoren nicht gezeigt werden konnte, müssen wir schließen, daß die Salyrganwirkung Ausdruck einer verminderten Rückresorption ist. Da die Salyrganwirkung häufiger unter Atropin noch verstärkt wird, muß man annehmen, daß auch Atropin die Rückresorption vermindert. Es würde sich dabei um eine der Verminderung der Sekretion analoge Hemmung der Zelltätigkeit handeln, die unter den Bedingungen der Wasserbelastung nicht auftritt oder nicht nachweisbar wird. Die Salyrganwirkung ist dabei

---

[10] Bonsmann, M. R. u. M. Müller-Neff: Arch. exper. Path. (D.) **179**, 77 (1935). — [11] Marx, J.: Diss. Gießen 1940. — [12] Szabo, M.: Z. Altersforsch. **3**, 155 (1941). — [13] Claussen, F.: Z. exper. Med. **83**, 231 (1932). — [14] Fromherz, K.: Arch. exper. Path. (D.) **200**, 571 (1943). — [15] Hotovy, R.: Arch. exper. Path. (D.) (im Druck).

wahrscheinlich renal bedingt, da sie ohne oder nur mit geringer Latenz auftritt. Der primäre Angriffspunkt des Atropins ist in diesen Versuchen am ganzen Tier nicht klargestellt, da wir nur über renale Vorgänge Auskunft geben können, die primär vielleicht nervös oder humoral ausgelöst werden. Es ist z. B. an die Möglichkeit zu denken, daß Atropin auf dem Wege über eine zentrale Parasympathicushemmung wirksam ist und als deren Folge durch Enthemmung eine Förderung der HHL-Sekretion herbeiführt. Dafür spricht einerseits die Hemmung der Wasserdiurese durch beide Stoffe, andererseits die Vermehrung der Grunddiurese, die für den HHL durch Fromherz[6], sowie Unna und Walterskirchen[7] und für das Atropin von uns nachgewiesen ist. Die Verstärkung der Salyrganwirkung durch Atropin in unseren Versuchen würde, wenn sich diese Ansicht bestätigen ließe, auf eine Vermehrung der HHL-Sekretion zu beziehen sein, zumal nach Unna und Walterskirchen[16] die Salyrganwirkung durch HHL nicht gehemmt, vielleicht sogar entsprechend unseren Atropinversuchen gesteigert würde. Auch die von v. Nyary[17] beobachtete Steigerung der Novuritwirkung durch Luminal läßt sich vielleicht durch eine dem Atropin analoge Enthemmung der HHL-Sekretion erklären.

Die Versuche ergaben, daß der Diurese nach Wasserbelastung und nach Salyrgan verschiedene Mechanismen zugrunde liegen, d e durch das verschiedene Verhalten gegenüber dem Atropin aufgezeigt werden konnten. Atropin hemmt nicht unspezifisch, auch nicht etwa über die Papillarmuskeln, jede Wasser- und Chloridausscheidung, sondern nur jene, die durch aktive Tubulussekretion vermehrt ist.

Dies und der Befund, daß selbst große Atropindosen auf die Salyrgandiurese keine Wirkung haben, sprechen sehr für die Eignung des Atropins zum Nachweis des Anteils der Tubulussekretion an der Harnbildung. Deshalb sollen weitere Diuretika nach diesem Gesichtspunkte untersucht werden.

Zusammenfassung.

1. An weiblichen Hunden wurde unter den Bedingungen der Grunddiurese nach intravenöser Injektion von theophyllinfreiem Salyrgan in einer schwellennahen Dosierung eine Vermehrung der Wasser- und Chloridausscheidung erzielt.

2. Hohe Dosen Atropin hemmen auch bei wiederholter Verabreichung die Salyrganwirkung nicht, sondern verstärken sie in einem großen Teil der Fälle in bezug auf Intensität und Dauer. Das Chlorid wird verhältnismäßig noch stärker ausgeschieden.

---

[16] Unna, K. u. L. Walterskirchen: Arch. exper. Path. (D.) **186**, 539 (1937).
[17] Nyary, A. v.: Arch. exper. Path. (D.) **162**, 475 (1931).

3. Atropin wirkt beim Hund unter den Bedingungen der Grunddiurese fördernd auf die Wasser- und Chloridausscheidung.

4. Aus diesen Befunden wird geschlossen, daß Salyrgan in Übereinstimmung mit der Ansicht anderer Autoren durch Verminderung der Rückresorption wirksam ist. Im Gegensatz zur Wasserdiurese, an der nach unserer Auffassung die Sekretion beteiligt ist, läßt sich eine solche für Salyrgan nicht nachweisen. Der Atropintest hat sich als spezifisch erwiesen und ermöglicht eine Gruppierung der Diuretika.

5. An Ratte und Maus ließ sich durch theophyllinfreies Salyrgan und Novurit bei verschiedenen Belastungen keine Wirkung auf Wasser- und Chloridausscheidung erzielen. Auf die Sonderstellung der Ratte im Diureseversuch wird hingewiesen.

Aus dem Pharmakologisch-Pharmakognostischen Institut der früheren Deutschen Karls-Universität in Prag (Direktor: Dr. G. Kuschinsky).

Diurese, Filtration und Sekretion der Niere unter dem Einfluß verschiedener Pharmaka.

VI. Mitteilung.

Die Wirkung von Testosteron auf Wasser- und Chloridausscheidung bei Ratte und Hund.

Von

G. Kuschinsky, H. Langecker und R. Hotovy.

(Eingegangen am 15. Februar 1945.)

Nach Zufuhr von Testosteron (T.) haben Selye[1], sowie Ludden, Krüger und Wright[2] an der Maus und der Ratte zuerst Gewichtszunahme der Nieren und eine Hypertrophie des Tubulusepithels festgestellt. Ähnliche Befunde wurden an Ratte und Maus von Korenchevsky und Ross[3] und Wrete[4] erhoben. Nach Selye und Friedmann[5] verhindert T. die Nierenatrophie nach einseitiger Ureterligatur bei der Maus. Feyel[6] beobachtete an der Maus bei chronischer Nephritis nach T. Hypertrophie und Restitution der Nierenstruktur. Dagegen konnte er die von Selye[6a] beobachtete Schutzwirkung gegen Sublimat nicht bestätigen. Nach diesen morphologischen Befunden war mit der Möglichkeit zu rechnen, daß gleichzeitig auch eine Funktionsänderung der hypertrophierten Tubuluszellen eintritt. Da wir aus unseren Befunden[7] auf eine Sekretion im Tubulusapparat schließen, müßte diese Hypertrophie mit einer Steigerung auch der Wasser- und Chloridausscheidung einhergehen. Eine Diuresesteigerung ist bisher nach T. beim Menschen im Volhardschen Wasserversuch von Ratschow[8] beschrieben worden. Nach Gerstenberger[9] entspricht die Diureseförderung durch 25 mg männlichen Sexualhormons beim Menschen etwa einer intramuskulären Injektion von 1 ccm Salyrgan. Oettel[10]

---

[1] Selye, H.: J. Ur. **42**, 637 (1939). — [2] Ludden, Krüger and Wright: Endocrinology (Am.) **28**, 619 (1941). — [3] Korenchevsky and Ross: Brit.med. J. **1940**, 645. — [4] Wrete, M.: Uppsala Läkför. Förh. **48**, 393 (1943). Zit. nach Chem. Z. **114**, 2163 (1943). [5] Selye, H. and S. M. Friedmann: Endocrinology (Am.) **29**, 80 (1941). — [6] Feyel, P.: Ann. Endocrin. **4**, 93 (1943). Zit. nach Chem. Z. **114**, 1885 (1943). — [6a] Selye, H.: Journ. Pharm. a. exp. Ther. **68**, 454, (1940). — [7] Kuschinsky, G. u. H. Langecker: Arch.: exper. Path. **204**, 718 (1947). — [8] Ratschow, M.: Dtsch. Arch. klin. Med. **189**, 104 (1942). — [9] Gerstenberger, H.: Z. exper. Med. **113**, 755 (1944). — [10] Oettel, H.: Klin. Wschr. **1943**, 724.

konnte beim Hund nach intravenöser Injektion von 1 mg/kg Testosteron-Glukosid-Phosphat keine eindeutige Wirkung auf die Diurese beobachten. THORN und ENGEL[11] stellten beim männlichen normalen Hund nach subkutanen Injektionen von T. eine Abnahme der Natrium- und Chloridausscheidung und keine Zunahme der Wasserausscheidung fest. Bei der Ratte konnten SELYE und BASETT[12] unter den von ihnen gewählten Bedingungen keinen Einfluß des T. auf die Tagesharnausscheidung beobachten. Wir haben die Wirkung des T. an der Ratte und am Hund unter verschiedenen Belastungen geprüft.

A. Versuche an der Ratte.

Methodik.

Die in Tabelle 1 wiedergegebenen akuten Diureseversuche waren angeordnet wie in der früheren Arbeit [13] angegeben. Auch hier wurden nur männliche Ratten verwendet. Als T.-Präparat wurde Testoviron* (Testosteronpropionat) 25 mg/ccm öliger Lösung bzw. freies Testosteron in Glyzerindiäthyläther gelöst (10 mg in 1 ccm) in Dosen von 0,2—0,3 mg je 300 g Ratte injiziert.

In Versuchen mit wiederholten T.-Gaben erhielten die Ratten von 90—130 g 0,2 ccm Testoviron = 5 mg Testosteronpropionat in öliger Lösung (Sesamöl) subkutan täglich injiziert (Tabelle 2).

Versuchsergebnisse.

Unter geeigneten Bedingungen läßt sich an der Ratte eine diuretische Wirkung im akuten Versuch des T. nachweisen (s. Tabelle 1). Im einzelnen waren die Ergebnisse folgende:

Grunddiurese ohne Belastung (Versuch 1—2). In beiden Versuchen wurde die Wasserausscheidung beträchtlich vermehrt.

Belastung mit Wasser bzw. 0,2% NaCl-Lösung per os (Versuch 3—6). In 4 Versuchen wurde keine Zunahme der Wasser- und Chloridausscheidung festgestellt.

Belastung mit 0,2% NaCl-Lösung subkutan (Versuch 7—11). In 4 von 5 Versuchen war eine Zunahme der Wasser- und Chloridausscheidung festzustellen, die in einem Versuch das Doppelte erreichte.

Belastung mit 0,6% NaCl-Lösung subkutan (Versuch 12—13). In 1 von 2 Versuchen trat eine beträchtliche Vermehrung der Wasser- und Chloridausscheidung ein.

Belastung mit 0,9% NaCl-Lösung subkutan (Versuch 14—15). In beiden Versuchen war die Wasserausscheidung etwas vermindert, die Chloridausscheidung in einem Falle.

---

[11] THORN, G. W. u. L. L. ENGEL: J. exper. Med. (Am.) **68**, 299 (1938). — [12] SELYE, Hand L. BASETT: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **45**, 272 (1940). — [13] LANGECKER, H. u. G. KUSCHINSKY: Arch. exp. r. Path. **204**, 738 (1947).

* Die Präparate wurden uns in dankenswerter Weise von der Firma *Schering A.G., Berlin*, zur Verfügung gestellt.

Belastung mit 0,2% NaCl-Lösung intraperitoneal (Versuch 16). In diesem Versuch blieb die Wasser- und Chloridausscheidung nach T. unverändert.

Nach wiederholter T.-Verabreichung ergab sich bei Belastung der Tiere mit 3 ccm Wasser per os:

1. Nach 5maliger T.-Verabreichung war keine Diuresesteigerung festzustellen (Versuch 1, Tabelle 2).

2. Nach 12maliger T.-Verabreichung war eine Steigerung der Wasser- und Chloridausscheidung festzustellen (Versuch 2, Tabelle 2).

3. Nach 25maliger T.-Verabreichung war die Wasser- und Chloridausscheidung bei den mit T. behandelten Ratten gegenüber den mit Sesamöl behandelten bedeutend erhöht. Beim Vergleich mit dem Versuch 1, in dem dieselben Tiergruppen verwendet wurden, zeigen jedoch die mit T. behandelten Ratten eine sehr geringe Erhöhung der Diurese, während die mit Sesamöl behandelten im Versuch 3 eine stark verminderte Wasserausscheidung aufweisen (Versuch 3, Tabelle 2).

Als Test für die Nierenhypertrophie nach T. wurden die Organgewichte der unbehandelten Ratten bestimmt.

1. Organgewichte von Ratten, die 14 Tage lang mit T. bzw. Sesamöl behandelt wurden (Tiere vom Versuch 2, Tabelle 2):

Niere	0,92	(0,97) g
Hoden	1,71	(1,47) g
Nebenniere	29,0	(29,5) mg
Hypophyse	3,68	(2,85) mg
Schilddrüse	23,6	(25,2) mg

2. Organgewichte von Tieren, die 28 Tage lang mit T. bzw. Sesamöl behandelt wurden (Versuchstiere vom 1. und 2. Versuch, Tabelle 2):

Niere	0,94	(1,22) g
Hoden	1,67	(1,86) g
Nebenniere	30,9	(37,6) mg
Hypophyse	3,3	(4,47) mg
Schilddrüse	35,3	(30,6) mg

(Sämtliche Werte sind auf 100 g Körpergewicht bezogen. Die Werte der Organe der mit T. behandelten Tiere stehen in Klammern.)

B. Versuche am Hund.

Zwei Versuche wurden an Hunden unter den Bedingungen der Grunddiurese durchgeführt[7]. Nach 25 mg T. i. m. in öliger Lösung zeigte ein Hund von $7^1/_2$ kg keine Beeinflussung der Wasser- und Chloridausscheidung. Ein Hund von 11 kg zeigte gleichfalls nach intravenöser Injektion von 25 mg T. in Glyzerindiäthyläther gelöst keinerlei Beeinflussung der Diurese und eine Abnahme der Chloridausscheidung auf die Hälfte.

Ein Versuch wurde mit peroraler Wasserbelastung ausgeführt. Der Hund erhielt um 7 Uhr früh 100 ccm Leitungswasser per os und von 9 Uhr an halbstündlich 20 ccm Wasser per os. Ferner um 9 Uhr 25 mg T. in öliger Lösung i.m. injiziert.

Tabelle 1. *Wirkung von Testosteron auf Wasser- und Chloridausscheidung bei der Ratte unter verschiedenen Belastungen.* (Die Zahlen bedeuten Mittelwerte von 4 Gruppen zu je 4 Tieren.)

Vers.-Nr.	Dosis je 100 g Ratte	Ausscheidung je 100 g Ratte		
		Harn in ccm		Cl mg
		4 St.	6 St.	4 St.
1	0,03 ccm Oleum raparum i.m.	0,048	0,18	—
	(+ 0,08 mg Testosteron (T.)	(0,19)	(0,33)	(—)
2	0,03 ccm Oleum raparum i.m.	0,17	0,42	—
	(+ 0,08 mg T.)	(0,37)	(0,65)	(—)
3	1,5 ccm Leitungswasser per os + 0,08 ccm Glyzerindiäthyläther (Gl.) subkutan	1,46	2,32	2,82
	(+ 0,17 mg T. in 0,08 ccm Gl.)	(1,21)	(1,74)	(2,08)
4	2,5 ccm Leitungswasser per os + 0,08 ccm Gl. subkutan	0,92	1,64	2,79
	(+ 0,17 mg T. in 0,08 ccm Gl.)	(0,99)	(1,63)	(3 11)
5*	4 ccm Leitungswasser per os + 0,08 ccm Gl. subkutan	3,24	3,87	0,82 0,96
	(+ 0,17 mg T. in 0,08 ccm Gl.)	(3,21)	(3,81)	(0,96) (0,86)
6	1,5 ccm 0,2% NaCl per os + 0,08 ccm Gl. subkutan	1,45	2,21	3,21
	(+ 0,17 mg T. in 0,08 ccm Gl.)	(1,95)	(2,29)	(4,45)
7	2,5 ccm 0,2% NaCl subkutan + 0,08 ccm Gl. subkutan	0,36	0,61	1,01
	(+ 0.17 mg T. in 0,08 ccm Gl.)	(0,69)	(1,02)	(1,41)
8	2,5 ccm 0,2% NaCl subkutan + 0,08 ccm subkutan	0,61	1,22	1,77
	(+ 0,17 mg T. in 0,08 ccm Gl.)	(0,82)	(1,31)	(3,91)
9	2,5 ccm 0,2% NaCl subkutan + 0,08 ccm Gl. subkutan	0,42	0,63	0,39
		(0,66)	(0,95)	(0,60)
10	2,5 ccm 0,2% NaCl subkutan + 0,08 ccm Gl. subkutan	1,31	1,90	2,15
	(+ 0,17 mg T. in 0,08 ccm Gl.)	(1,56)	(2,13)	(2,53)
11	2,5 ccm 0,2% NaCl subkutan + 0,08 ccm Gl. subkutan	1,68	2,07	2,28
	(+ 0,17 mg T. in 0,08 ccm Gl.)	(1,38)	(1,69)	(1,80)
12	2,5 ccm 0,6% NaCl subkutan + 0,03 ccm Oleum raparum i.m.	0,23	0,45	0,58
	(+ 0,17 mg T. in 0,03 ccm Oleum raparum)	(0,51)	(0,82)	(1,75)
13	2,5 ccm 0,6% NaCl subkutan + 0,03 ccm Oleum raparum i.m.	0,25	0,34	2,35
	(+ 0,17 mg T. in 0,03 ccm Oleum raparum)	(0,04)	(0,37)	(2,59)
14	2,5 ccm 0,9% NaCl subkutan + 0,03 ccm Oleum raparum i.m.	1,19	2,32	4,65
	(+ 0,17 mg T. in 0,03 ccm Gl. raparum)	(1,02)	(1,78)	(5,71)
15	2,5 ccm 0,9% NaCl subkutan + 0,03 ccm Gl. i. m.	0,50	1,25	2,93
	(+ 0,07 mg T. in 0,03 ccm Gl.)	(0,37)	(0,89)	(2,06)
16	10 ccm 0,2% NaCl i.p. + 0,03 ccm Oleum raparum i.m.	4,95	5,57	2,71
	(+ 0,08 mg T. in 0,03 ccm Gl.)	(5,09)	(5,79)	(2,78)

* In diesem Versuch wurde der Harn nach 3 Stunden und nach 8 Stunden analysiert.

Tabelle 2. *Die Wirkung des Testosteronpropionats auf Wasser- und Chloridausscheidung der Ratte nach wiederholter Zufuhr.* (Die Gruppen des 1. und 3. Versuches sind identisch.)

Vers.-Nr.	Dosis auf eine Ratte	Ausscheidung je Ratte			Gr. = Gruppe
		Harn in ccm		Cl mg	
		4 St.	6 St.	4 St.	
1	3 ccm Leitungswasser per os, 5 Tage lang täglich 0,2 ccm Sesamöl sc. (5 Tage lang täglich 0,2 ccm Testoviron = 5 mg Testosteronpropionat/T. sc.)	1,75	2,42	2,05	1. Gr. zu 4 Tieren
		2,32	2,75	2,5	2. Gr. zu 4 Tieren
		2,25	2,4	2,4	3. Gr. zu 4 Tieren
		(2,37)	(2,77)	(3,07)	4. Gr. zu 4 Tieren
		(2,72)	(2,87)	(2,4)	5. Gr. zu 4 Tieren
		(2,2)	(2,4)	(2,2)	6. Gr. zu 4 Tieren
2	3 ccm Leitungswasser per os, 12 Tage lang täglich 0,2 ccm Sesamöl sc. (12 Tage lang täglich 0,2 ccm Testoviron = 5 mg T. sc.)	1,45	1,62	2,6	1. Gr. zu 7 Tieren
		(2,09)	(2,14)	(4,1)	2. Gr. zu 7 Tieren
3	3 ccm Leitungswasser per os, 25 Tage lang täglich 0,2 ccm Sesamöl sc. (25 Tage lang täglich 0,2 ccm Testoviron = 5 mg T. cs.)	0,82	1,17	3,9	1. Gr. zu 4 Tieren
		0,4	0,75	3,1	2. Gr. zu 4 Tieren
		1,1	1,4	4,7	3. Gr. zu 4 Tieren
		(2,4)	(2,8)	(3,7)	4. Gr. zu 4 Tieren
		(3,1)	(3,3)	(5,2)	5. Gr. zu 4 Tieren
		(2,7)	)2,7)	(3,86)	6. Gr. zu 4 Tieren

Zur Kontrolle wurde eine Woche vorher und nachher an demselben Tier die Wasserbelastung ohne T. durchgeführt. Die Diurese blieb auch in diesem T.-Versuch unbeeinflußt. Die Chloridausscheidung war niedriger als an den Kontrolltagen. Da aber die Chloridausscheidung schon in den ersten Stunden viel niedrieger lag als in den Kontrollversuchen, kann die erniedrigte Chloridausscheidung nicht auf T. bezogen werden.

Ein Hund von 24 kg erhielt eine Lösung von 3,6% Inulin, 250 mg-% Phenolrot in 12 Milli-Mol-% Kochsalz mit einer Geschwindigkeit von 0,7 ccm/Min. infundiert (Angaben über die Versuchsanordnung siehe frühere Arbeiten [7]). Nach einer 3stündigen Vorperiode wurden 10 mg T. in öliger Lösung injiziert: Wasser-, Chlorid- und Phenolrotausscheidung blieben unverändert, die Natriumausscheidung stieg auf 170%, die Inulin-Clearance zeigte eine geringe Zunahme.

Besprechung der Ergebnisse.

Die akuten Versuche zeigen, daß T. nur ohne Belastung und bei einer subkutanen Zufuhr von 0,2 bzw. 0,6% NaCl-Lösung einen diuretischen Effekt hat, während unter einer Belastung mit Wasser und 0,2% NaCl-Lösung per os, sowie 0,2% NaCl-Lösung intraperitoneal T. keine Wirkung hat. Bei subkutaner Belastung mit 0,9% NaCl-Lösung wirkt T. sogar diuresehemmend. Diese Befunde sind an einem sehr großen Tiermaterial erhoben worden. Im Gegensatz zu den Versuchen von Ratschow beim Menschen ist an der Ratte die orale Belastung nicht geeignet, eine diuretische T.-Wirkung zu demonstrieren. In Anbetracht der morphologischen Befunde, welche eine Hypertrophie gerade der

Nierenepithelzellen im Tubulus ergeben haben, erscheint die Annahme berechtigt, daß die Diuresesteigerung auf eine Mehrfunktion, d. h gesteigerte Sekretion der genannten Zellen zu beziehen ist. Eine solche Annahme würde mit unserer Anschauung über die Beteiligung der Sekretion an der Harnbildung gut übereinstimmen. Daß die Diurresehemmung durch Atropin an der Ratte[13] eine ähnliche Abhängigkeit von der Art der parenteralen Belastung, d. h. Kochsalzkonzentration zeigt, wie die Diuresesteigerung durch T., spricht dafür, daß es sich in beiden Fällen um gegensätzliche Wirkungen an demselben Mechanismus handelt.

Die Versuche mit wiederholter T.-Behandlung zeigen, daß T. mit Wasserbelastung von 3 ccm nach 12- und 25tägiger Behandlungsdauer eine leichte Diuresesteigerung hervorruft. Gleichzeitig wurde aber festgestellt, daß das Sesamöl eine schädigende Wirkung besitzt, die sich in einer verminderten Wasserausscheidung äußert. Durch T. konnte diese Schädigung offenbar verhindert werden. Nach 14tägiger T.-Zufuhr konnte noch keine Nierengewichtsvergrößerung festgestellt werden, während nach 28 Tagen eine Erhöhung von 0,94 g auf 1,22 g (auf 100 g Körpergewicht bezogen) erfolgte. Auch das Hypophysengewicht war bei den T.-Tieren im Durchschnitt größer als bei den Kontrolltieren. Die negativen Ergebnisse von Selye und Basett bei der Ratte sind wohl durch ungünstige Beobachtungszeiten und Belastungsbedingungen zu erklären. In drei Versuchen am Hund konnten wir keine Vermehrung der Wasserausscheidung erzeugen, allerdings ist nur der Grunddiureseversuch hinsichtlich der Belastung mit den Rattenversuchen vergleichbar.

Zusammenfassung.

1. T. bewirkt an der Ratte bei der Grunddiurese und bei geeigneter Belastung eine Vermehrung der Wasser- und Chloridausscheidung. An diesem Mechanismus scheint das Chlorid beteiligt zu sein.

2. Im Versuch mit wiederholter T.-Verabreichung bewirkt das T. bei Wasserbelastung nur eine geringe Diuresesteigerung, verhindert anscheinend die schädigende Wirkung des Sesamöls auf die Niere und ruft eine Vergrößerung des Nierengewichtes hervor.

3. In Anbetracht der durch T. erzeugten Hypertrophie der Tubulusepithelzellen kann die beobachtete Diuresesteigerung auf eine Mehrfunktion, d. h. gesteigerte Sekretion der Tubuluszellen bezogen werden.

4. In wenigen Versuchen am Hund konnte keine Beeinflussung der Diurese durch T. nachgewiesen werden.

Aus dem Pharmakologisch-Pharmakognostischen Institut der früheren Deutschen Karls-Universität in Prag (Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky).

Über die Wirkung verschiedener galletreibender Mittel auf die Diurese der Ratte.

Von

R. Hotovy.

(Eingegangen am 25. November 1944.)

Die Gallensäuren, insbesondere die Cholsäure und Dehydrocholsäure, besitzen außer der galletreibenden Wirkung noch eine klinisch und experimentell nachgewiesene diuretische Wirkung. Eine feste Beziehung zwischen Cholerese und Diurese nach Verabreichung von Gallensäuren läßt sich nicht feststellen. Beim Menschen tritt nach einer intravenösen Decholingabe die Diurese dann besonders hervor, wenn eine Stauungs- oder eine cirrhotisch veränderte Leber vorliegt (Bix[1], Königer[2]). Aber auch beim Herz- und Nierengesunden kann Decholin diuretisch wirksam sein (Rahmlow und Ritterband[3], Adlersberg und Taubenhaus[4], Semler[5]). Fel tauri ruft nach peroraler Verabreichung ebenfalls eine Steigerung der Harnausscheidung hervor (Landau und Held[6], Lebermann[7]). Decholin und Rindergalle besitzen also neben dem cholagogen noch einen bedeutenden diuretischen Effekt. Fromherz[8] konnte in seinen Versuchen über die cholagoge Wirksamkeit der Gallensäuren bei der Ratte feststellen, daß die Desoxycholsäure unwirksam ist oder hemmend auf die Gallensekretion wirke. Die Cholsäure, Taurocholsäure und Dehydrocholsäure sind dagegen stark galletreibend. Es zeigt sich, daß die Ratte in Beziehung auf die Cholerese anders als das Kaninchen und der Hund (Fromherz[8], Stransky[9], Kauftheil und Neubauer[10]) und ähnlich wie die Maus (Rothlin und Schalch[11]) reagiert. Die Kaninchen zeigen nach einer Dehydrocholsäuregabe eine starke und langdauernde Gallensekretion, die Cholsäure bewirkt nur eine ganz geringe kurze Steigerung der Gallenproduktion, während die Taurocholsäure und 12-Keto-Cholsäure unwirksam sind. Die Dehydrocholsäure erzeugt beim Hund nach intravenöser Verabreichung regelmäßig eine schnell einsetzende Diuresesteigerung (Kauftheil und Neubauer[10]).

Im folgenden sollen Beobachtungen über die diuretische Wirkung einiger galletreibender Mittel bei der Ratte mit Berücksichtigung ihres Effektes auf die Purinkörperdiurese mitgeteilt werden.

Methodik.

Für die Versuche dienten Ratten im Gewicht von 200—300 g, die unter einheitlichen Futter- und Umweltsbedingungen gehalten wurden. Es wurden 3 Diuresversuchsanordnungen verwendet:

1. der perorale Wasserstoß von 2,5 ccm destilliertem Wasser auf 100 g Körpergewicht,

2. ein solcher von 5 ccm destilliertem Wasser auf 100 g Körpergewicht,

3. eine intraperitonale Flüssigkeitsgabe von 10 ccm 0,6 und 1,2%iger Kochsalzlösung auf 100 g Ratte (SILVETTE[12]).

Die in Meßzylindern aufgefangenen Harnmengen wurden stundenweise gemessen und der Gesamtharn von 6 Stunden einer Chlorbestimmung nach VOLHARD-ARNOLD-SALKOWSKI unterworfen.

Als galletreibende Mittel wurden verwendet: Desoxycholsäure, desoxycholsaures Natrium, Fel tauri sicc., dehydrocholsaures Natrium (Decholin), Glykocholsäure, Cholsäure, Synthobilin (p-Tolyl-methylcarbinolcampherestersaures Diäthanolamin). Die unlöslichen Gallensäuren wurden in einer 3%igen Gummiarabicumlösung feinst suspendiert verabreicht. Um die eventuell auftretende Diuresehemmung auch bei einem Diureticum zu zeigen, wurde in einigen Versuchsreihen Theobromin oder Theophyllin (5 mg/100 g Ratte) per os gleichzeitig mit Natrium desoxycholicum verabreicht.

Versuchsergebnisse.

1. Versuche mit 2,5 ccm Aqua dest. auf 100 g Körpergewicht.

2,5 mg Desoxycholsäure auf 100 g Ratte mit dem Wasser per os verabreicht, zeigte eine leichte Diuresesteigerung, die aber im Bereich der Streuung der Werte lag. Die Chlorausscheidung war gegenüber dem normalen Versuch verdoppelt. 5 mg Desoxycholsäure zeigte keine deutliche Diuresehemmung, aber eine Verminderung der Chlorausscheidung. Bei gleichzeitiger Gabe von 5 mg Theophyllin wurde die Diurese gehemmt. Die Desoxycholsäure hemmt also die durch Theophyllin erzeugte Diurese und die dadurch bewirkte Wasser- und Chlorausscheidung. Eine Beeinträchtigung des körperlichen Befindens konnte nicht festgestellt werden.

Versuche. Im folgenden bedeuten die Werte in den Zahlenreihen die jeweils nach 1—6 Stunden ausgeschiedenen Harnmengen. Es handelt sich um Mittelwerte in Kubikzentimeter auf 100 g Körpergewicht bezogen, aus der angegebenen Anzahl von Ratten.

2,5 mg Desoxycholsäure/100 g Ratte per os (16 Ratten): 0,8; 1,2; 1,3; 1,5; 1,5; 1,6 (Chlorgehalt: 1,1 mg);

5 mg Desoxycholsäure/100 g Ratte per os (16 Ratten): 0,8; 1,0; 1,1; 1,1; 1,2; 1,6 (Chlorgehalt: 0,2 mg);

Diurese ohne Desoxycholsäure (48 Ratten): 0,6; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,6 (Chlorgehalt: 0,6 mg);

5 mg Theophyllin/100 g Ratte per os (16 Ratten): 1,5; 2,0; 2,3; 2,5; 2,6; 2,8 (Chlorgehalt: 9,8 mg);

5 mg Theophyllin und 5 mg Desoxycholsäure/100 g Ratte per os (16 Ratten): 1,0; 1,6; 1,8; 1,9; 2,1; 2,2 (Chlorgehalt: 3,7 mg).

2. Versuche mit 5 ccm Aqua dest. auf 100 g Körpergewicht per os.

a) Natrium glycocholicum. 5 mg Natrium glycocholicum/100 g Ratte per os zeigt eine geringere Wasserdiurese gegenüber dem Parallelversuch ohne dasselbe. Der Chlorgehalt der Harne ist auch geringer.

Versuch. 5 mg Natrium glycocholicum/100 g Ratte per os (20 Ratten): 1,6; 2,5; 3,1; 3,4; 3,6; 3,8 (Chlorgehalt: 5,6 mg);
ohne Natrium glycocholicum (20 Ratten): 2,4; 3,4; 3,6; 4,2; 4,3; 4,8 (Chlorgehalt: 7,9 mg).

b) Decholin (Natrium dehydrocholicum). 5 mg Decholin per os je 100 g Ratte ist unwirksam in bezug auf die Harnausscheidung.

Versuch. 5 mg Decholin/100 g Ratte per os (16 Ratten): 1,9; 2,5; 2,7; 2,9; 3,0; 3,1 (Chlorgehalt: 2,0 mg);
ohne Decholin (16 Ratten): 1,3; 2,4; 2,9; 3,2; 3,2; 3,2 (Chlorgehalt: 2,5 mg).

30 mg Decholin/100 g Ratte per oszeigt eine leichte Diuresehemmung.

Versuch. 30 mg Decholin/100 g Ratte per os (20 Ratten): 1,9; 2,6; 2,9; 3,0; 3,3; 3,7 (Chlorgehalt: 2,6 mg);
ohne Decholin (16 Ratten): 2,0; 2,9; 3,3; 3,6; 3,8; 4,0 (Chlorgehalt: 3,7 mg).

c) Cholalsäure. 5 mg Cholalsäure/100 g Ratte ist ebenfalls unwirksam.

Versuch. 5 mg Cholalsäure /100 g Ratte per os (20 Ratten): 1,8; 3,0; 3,4; 3,6; 3,7; 3,8 (Chlorgehalt: 3,5 mg);
ohne Cholalsäure (16 Ratten): 2,3; 3,1; 3,7; 3,8; 3,8; 4,0 (Chlorgehalt: 4,0 mg).

d) Synthobilin (p-Tolyl-methylcarbinol-campherestersaures Diäthanolamin). 10 mg Synthobilin/100 g Ratte ruft in den ersten 3 Stunden eine Diuresehemmung hervor, die sich in den folgenden Stunden wieder ausgleicht.

Versuch. 10 mg Synthobilin/100 g Ratte per os (16 Ratten): 0,2; 1,1; 1,8; 3,0; 3,3; 3,7 (Chlorgehalt: 4,0 mg);
ohne Synthobilin (16 Ratten): 0,7; 2,7; 3,3; 3,8; 4,0; 4,0 (Chlorgehalt: 4,0 mg);

e) Natrium desoxycholicum. 30 mg Natrium desoxycholicum erzeugt eine starke Diuresehemmung.

Versuch. 30 mg Natrium desoxycholicum/100 g Ratte per os (12 Ratten): 0,3; 0,3; 0,3; 0,6; 1,0; 1,5 (Chlorgehalt: 0,9 mg);
ohne Natrium desoxycholicum (12 Ratten): 1,9; 3,0; 3,5; 3,9; 3,9; 4,2 (Chlorgehalt: 1,9 mg).

3. Diurese nach Verabreichung von 0,6- und 1,2%iger Kochsalzlösung intraperitoneal (10 ccm Lösung auf 100 g Körpergewicht).

Diese Diureseanordnung (SILVETTE[12]) wurde angewandt, um die Beeinflussung der Diurese bei Kochsalzbelastung zu sehen.

Versuche mit 0,6%iger Kochsalzlösung: Fel tauri sicc. (5 mg/100 g Ratte) wirkt diuresehemmend.

Versuch. 5 mg Fel tauri sicc./100 g Ratte per os (16 Ratten): 0,1; 0,3; 0,3; 0,5; 0,6; 1,0 (Chlorgehalt: 4,7 mg);

ohne Fel tauri sicc. (16 Ratten): 0,7; 0,8; 0,9; 1,6; 2,2; 2,9 (Chlorgehalt: 12,6 mg).

Bei der nächsten Versuchsserie wurde Theobromin als Diureticum gegeben, um zu prüfen, ob die Desoxycholsäure die Purinkörperdiurese auch in dieser Versuchsanordnung, aber nach Kochsalzzufuhr, antagonistisch beeinflusse. Das desoxycholsaure Natrium hemmt hier die Theobromindiurese. Die Chlorausschwemmung ist entsprechend der Diuresehemmung geringer.

Versuch. 5 mg Theobromin/100 g Ratte ip. (12 Ratten): 1,6; 2,4; 3,0; 3,8; 4,4; 5,4 (Chlorgehalt: 27,9 mg);

5 mg Theobromin und 5 mg Natrium desoxycholicum/100 g Ratte ip. (16 Ratten): 0,1; 0,4; 0,7; 1,0; 1,3; 1,6; (Chlorgehalt: 7,1 mg).

Versuche mit 1,2%iger Kochsalzlösung. Diese Versuche zeigen, daß 5 mg desoxycholsaures Natrium bzw. 30 mg Decholin auf 100 g Körpergewicht intraperitoneal verabreicht ohne Wirkung auf die Diurese sind. 30 mg Natrium desoxycholicum intraperitoneal verabreicht ist bei der Ratte (100 g) tödlich, dieselbe Dosis Decholin wird dagegen gut vertragen.

Versuch. 30 mg Decholin/100 g Ratte ip. (20 Ratten): 0,3; 1,3; 1,5; 2,2; 2,6; 3,1 (Chlorgehalt: 36,1 mg);

ohne Decholin (20 Ratten): 0,4; 1,1; 1,4; 1,7; 2,7; 3,5 (Chlorgehalt: 37,5 mg).

Besprechung.

Die angeführten Diureseversuche zeigen, daß bei der Ratte nach Verabreichung von Desoxycholsäure eine Diuresehemmung auftritt. Die Diuresehemmung hält, in der Regel bei der höheren Dosierung, bis über 8 Stunden an. Die Diuresehemmung ist nur bei einem großen Kochsalzabgebot nicht sichtbar. Die Desoxycholsäure wirkt bei Hunden (4 g per os auf 20 kg Hund nach einem Wasserstoß von 1 Liter Wasser) nicht diuresehemmend. Decholin, das beim Hund eine sehr deutliche Diuresesteigerung hervorruft (KAUFTHEIL und NEUBAUER[4]), ist bei der Ratte unwirksam. Die übrigen untersuchten Gallensäuren sind ohne Wirkung. Synthobilin (p-Tolyl-methylcarbinolcampherestersaures Diäthanolamin) wirkt diuresehemmend.

Die Diuresehemmung nach Desoxycholsäure bei der Ratte kann extrarenal auf eine verstärkte Fähigkeit des Organismus Wasser zu binden zurückzuführen sein oder sie wird renal durch Verminderung der Nierenfiltration oder verstärkte Rückresorption hervorgerufen.

Die Theophyllin- und Theobromindiuresehemmung nach desoxycholsaurem Natrium ist in den gezeigten Versuchen sehr augenscheinlich.

Zusammenfassung.

1. Die Desoxycholsäure und ihr Natriumsalz wirken bei der Ratte auf die durch Wasserstoß ausgelöste Diurese hemmend.

2. Glykocholsäure, dehydrocholsaures Natrium (Decholin), Cholsäure sind ohne Wirkung auf die Diurese.

3. Fel tauri sicc., Synthobilin wirken diuresehemmend.

4. Die Theophyllin- und Theobromindiurese werden durch desoxycholsaures Natrium gehemmt.

Literatur.

[1] Bix, H.: Wien. klin. Wschr. **1927**, 321; **1928**, 1080. — [2] Königer, E.: Ther. Gegenw. **32**, 450 (1930). — [3] Rahmlow, K. u. H. Ritterband: Dtsch. med. Wschr. **1926**, 1992. — [4] Adlersberg, D. u. M. Taubenhaus: Biochem. Z. **177**, 400 (1926). — [5] Semler, R.: Med. Klin. **1926**, 891. — [6] Landau, A. et J. Held: Presse méd. **1925**, 333. — [7] Lebermann, F.: Dtsch. med. Wschr. **1927**, 2020. — [9] Fromherz, K.: Arch. exper. Path. (D.) **200**, 571 (1943). — [9] Stransky, E.: Biochem. Z. **143**, 438 (1923). — [10] Kauftheil, K. u. E. Neubauer: Arch. exper. Path. (D.) **166**, 675 (1932). — [11] Rothlin, E. u. W. R. Schalch: Helvet. physiol. Acta **2**, 249 (1944). — [12] Silvette, H.: Amer. J. Physiol. **128**, 747 (1940).

Nachtrag zum „Verzeichnis wissenschaftlicher Schriften von Emil Starkenstein†“[1].

Bereits 1907 veröffentlichte STARKENSTEIN als Student die Arbeit: „Über die Wirkung des Hydroxycoffeins und anderer Methylharnsäuren.“ Naunyn-Schmiedebergs Arch. **57**, 27.

[1] Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 16 (1947).

Nachtrag zu der Arbeit „Über die Wirkung des Nikotinsäureamids bei der Methylalkoholvergiftung der Ratte“[2].

Von HEINRICH KÜCHMEISTER.

Der Verfasser ist Herrn F. X. MAYER für seine Mitarbeit zu Dank verpflichtet.

[2] Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 555 (1947).

41B2127